

Ingeborg Engelhardt

ÜBER DAS VERHALTEN DER SCHWEFLIGEN
SÄURE IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN
UND DIE MÖGLICHKEITEN ZUR BESTIMMUNG

Frankfurt am Main 1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Über das Verhalten der schwefligen Säure in
biologischen Flüssigkeiten und die Möglich-
keiten zur Bestimmung

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
zu
Frankfurt am Main

vorgelegt
von
Ingeborg ENGELHARDT
Darmstadt
Mai 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Frankfurt am Main.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang F R A N Z .



1. Referent: Prof. Dr. Dr. W. Diemair
 2. Referent: Prof. Dr. G. Pfeleiderer
- Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1964
- Tag der Promotion: 27. Juli 1964

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für
Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-
Universität Frankfurt am Main auf Anregung von
Herrn Prof. Dr.ing. et Dr.phil. W. D i e m a i r
ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor
Dr. Dr. W. D i e m a i r möchte ich für die
Übertragung dieser Arbeit und die dazu gegebenen
Anleitungen und Ratschläge sehr herzlich danken.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. G. Pfeleiderer
für seine Ratschläge und die freundliche Erlaubnis,
die Enzympräparation in seinem Institut durchzu-
führen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für
die Unterstützung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	8
Anwendung und Eigenschaften der schwefligen Säure	9
Resorption, pharmakologische Wirkung und Ausscheidung der schwefligen Säure bei Mensch und Tier	13
Oxydation der schwefligen Säure im Organismus	20
Wirkung der schwefligen Säure auf Enzyme	27
Wirkung der schwefligen Säure auf Vitamine	27
Zusammenfassung	28
Problemstellung vorliegender Arbeit	30
II. <u>Experimenteller Teil</u>	31
1. Angewandte Methoden	33
Herstellung von Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherzen	36
Bestimmung von Sulfit mit der Hemmung der Lactat-Dehydrogenase	37
Bestimmung von Sulfit mit Malachitgrün	43
Bestimmung des Sulfits mit p-Rosanilinhydrochlorid und Formaldehyd	44
Bestimmung des Sulfits in Lebensmitteln mit der enzymatischen Methode	46
2. Untersuchung von, mit Sulfit behandeltem, Speichel, Magensaft, Duodenalsaft und Leberhomogenisat	49
Untersuchung von Speichel	49
Untersuchung von Magensaft	50
Untersuchung von Duodenalsaft	52
Untersuchung von Leberhomogenisat	55

	Seite
3. Untersuchung von Blut nach Zusatz von Sulfit	58
Bestimmung des Sauerstoffgehaltes des Blutes	60
Bestimmung des Hämoglobingehaltes	61
Vergleich des Sauerstoffgehaltes des Blutes mit den oxydierten Sulfitmengen	61
4. Untersuchung von Blutspektren	64
Verfolgung der Reduktion des Oxyhämoglobins anhand der Blutspektren	67
Untersuchung einer möglichen Ligandenbindung des Sulfits an das Hämeisen	73
5. Untersuchung der Wirkung des Sulfits auf Disulfidverbindungen, insbesondere auf das Blut und die Proteinkomponente des Hämoglobins	79
Bestimmung von SH-Gruppen im Blut mit p-Chlormercuribenzoat	79
Darstellung von Globin aus Hämoglobin	81
Polarographische Bestimmung von SH-Gruppen	81
Bestimmung von SH-Gruppen mit N-Äthylmaleinimid	84
6. Untersuchung der Wirkung des Sulfits auf Alkohol-Dehydrogenasen	91
Hemmung der Acetaldehydhydrierung durch Sulfit mit Leber-Alkohol-Dehydrogenase	92
Hemmung der Acetaldehydhydrierung durch Sulfit mit Hefe-Alkohol-Dehydrogenase	94
Hemmung der Brenztraubensäurehydrierung durch Sulfit mit Lactat-Dehydrogenase	96
Hemmung der Alkoholdehydrierung durch Sulfit mit Leber-Alkohol-Dehydrogenase	98
Hemmung der Alkoholdehydrierung durch Sulfit mit Hefe-Alkohol-Dehydrogenase	98
Messung der DPN-Sulfit-Enzym-Komplexe	99
7. Jodometrische Bestimmung der freien schwefligen Säure in Magensäften und Globinlösungen	101
III. <u>Zusammenfassung</u>	107
IV. <u>Diskussion</u>	112
V. <u>Literaturverzeichnis</u>	114

E I N L E I T U N G

Die schweflige Säure wird seit altersher als ein wichtiges Desinfiziens, Konservierungsmittel und Antioxidans bei der Herstellung und Zubereitung von Nahrungsmitteln verwendet. Sie ist in vielen Fällen, z.B. bei der Weinbereitung, Zucker- und Stärkeproduktion unentbehrlich geworden. Sie konnte, trotz verschiedener Bemühungen noch nicht durch andere Stoffe gleichwertig ersetzt werden.

Bei Nahrungsmitteln, deren Weiterverarbeitung nur eine ganz geringe Menge schwefliger Säure im Endprodukt erwarten läßt, dient sie als technischer Hilfsstoff. Die zugesetzten Mengen werden nicht gesetzlich geregelt. Nahrungsmittel, denen schweflige Säure direkt zugesetzt wird, unterliegen der Deklarationspflicht. Die Menge der schwefligen Säure ist durch Verordnungen festgelegt. Nach dem deutschen Weingesetz gilt die schweflige Säure als technischer Hilfsstoff. Bei der Schwefelung des Weines gelangen aber nicht unerhebliche Mengen schweflige Säure in das Endprodukt. So wurden durch Ministerialerlaß in Hessen 50 mg freie und 300 mg gebundene schweflige Säure im Liter Wein als Höchstgrenze festgesetzt. Die in anderen Ländern zugelassenen Mengen schwanken zwischen 20 bis 100 mg freie und 125 bis 500 mg gebundene schweflige Säure im Liter Wein. Der verstärkte Handel innerhalb der einzelnen europäischen und auch überseeischen Länder macht eine Angleichung der zugelassenen Mengen schwefliger Säure notwendig. Da dies für die Bundesrepublik eine Heraufsetzung der erlaubten Menge an schwefliger Säure bedeutet, muß zuvor die Unbedenklichkeit, d.h. eine genaue Kenntnis der Wirkung und des Schicksals der schwefligen Säure im menschlichen Organismus geklärt werden.

Die schweflige Säure wird durch Einleiten von Schwefeldioxid-Gas in Wasser hergestellt. Die wässrige Lösung enthält dann gelöstes Gas SO_2 , undissoziierte Säure H_2SO_3 , Bisulfitionen HSO_3^- und Sulfitionen SO_3^{--} . Die Verteilung der verschiedenen Formen in wässriger Lösung ist pH - abhängig. O. R a h n und I.E. C o n n (1) haben die Zusammensetzung von Sulfitlösungen bei verschiedenen pH-Werten unter Benutzung der Michaelis-

formeln berechnet. Da es für die Wirkung der schwefligen Säure wichtig ist, in welcher Zustandsform sie vorliegt, sollen hier die berechneten Gehalte, ausgedrückt in relativen Zahlen, angeführt werden (Tab. 1).

Tab. 1

pH	SO_3^{--}	HSO_3^-	H_2SO_3
1,0	0	0,145	0,855
2,0	0	0,630	0,370
2,48	0,001	0,836	0,163
2,94	0,005	0,932	0,063
4,0-4,1	0,047	0,948	0,0056-0,0050
4,97	0,332	0,667	0,0004
5,9-5,82	0,804	0,196	10^{-5}
6,08	0,838	0,142	10^{-5}
6,12	0,870	0,130	0
6,40	0,926	0,074	0
6,80	0,969	0,031	0
6,75-7,0	0,968-0,970	0,032-0,020	0
7,05-7,25	0,975-0,980	0,019-0,014	0
7,6	0,996	0,004	0
7,6-7,8	0,997	0,0032	0
8,0	0,998	0,002	0

Diese Zustandsformen wurden auch von K. V a s und H. I n g r a m (2) berechnet und zeichnerisch wie folgt festgehalten (Abb. 1).

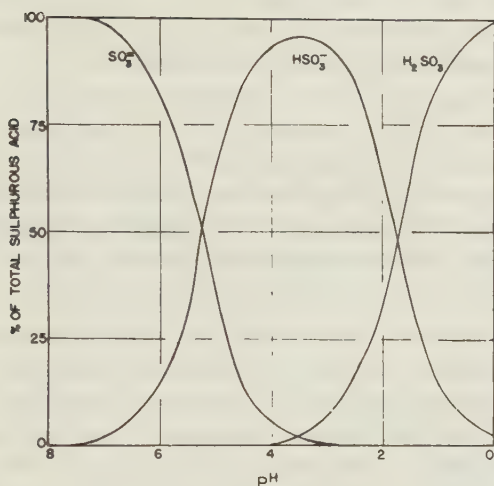


Abb. 1 Zustandsformen der schwefligen Säure bei verschiedenen pH-Werten, ausgedrückt in Prozent der gesamten schwefligen Säure nach V a s und I n g r a m .
Abb. 1 wurde der Arbeit von M.A. Joslyn und J.B.S. Braveman (3) entnommen.

Unter freier schwefliger Säure versteht man die Gesamtheit dieser Zustandsformen, die sich mit Jod direkt titrieren lassen.

Die schweflige Säure bildet aber leicht mit ungesättigten Verbindungen Anlagerungsprodukte. So reagiert das Bisulfition mit ungesättigten organischen Stoffen, die folgende Gruppen enthalten, $-\text{C}=\text{C}-$ und $>\text{C}=\text{O}$, zu α -Hydroxisulfonsäuren und Sulfonsäuren. Ferner reagieren Amine und Schiffsche Basen mit Bisulfiten. Auch die α -Hydroxisulfonsäuren können mit Aminen zu substituierten α -Aminosulfonaten reagieren (3).

Sulfit reagiert auch mit Disulfiden. H.T. C l a r k e (4) konnte bei der Einwirkung von Sulfit auf Cystin keine Oxidation des Sulfits nachweisen, obwohl das Cystin teilweise reduziert wurde. Nach Identifizierung der Reaktionsprodukte stellte er folgende Reaktionsgleichung auf:



Beim Ansäuern einer mit Sulfit versetzten Cystinlösung und nach dem Vertreiben des überschüssigen Sulfits durch Erhitzen erhielt er 95 bis 125% mehr Cystein, jodometrisch bestimmt, als er es nach der Gleichung erwarten konnte. Er nahm an, daß das S - Cysteinsulfonat hydrolysiert wurde.

W. S t r i c k s und J.M. K o l t h o f f (5) stellten fest, daß die Reaktion zwischen Cystin und Sulfit im alkalischen Milieu zwischen pH 8 und 13 reversibel ist. Das Gleichgewicht stellte sich von beiden Seiten gleich schnell ein. Die Gleichgewichtskonstante war aber abhängig von der Anzahl der freien Aminogruppen der Aminosäuren, die Disulfidbrücken enthalten. So war die Reaktionskonstante von Sulfit mit Cystin 21 mal größer, als die von Dithiodiglykolsäure. Die Reaktion zwischen Sulfit und Dithiodiglykolsäure war zwischen pH 6 bis 9 reversibel. Das Gleichgewicht stellte sich in alkalischen Lösungen schneller ein, als in sauren Lösungen.

J.L. B a i l l e y und R.D. C o l e (6) haben die Reaktion des Sulfits mit Proteinen studiert. Sie konnten oxidiertes Glutathion, Insulin, Ribonuklease, Trypsinogen und Chymotrypsinogen mit Sulfit aufspalten. Führt man die Reaktion in 8 M Harnstoff bei pH 7.4 und der 10 bis 50 fachen, der Disulfidgruppen äquivalenten Menge an Sulfit aus, und entfernten sie die entstehenden Sulphydrylgruppen durch Oxidation aus dem Reaktionsgleichgewicht, so konnten sie alle untersuchten Proteine in die S - Sulfonate überführen. Eine Aminosäureanalyse der S - Sulfonate zeigte, daß das Sulfit keine andere Aminosäure außer dem Cystin angreift.

Unter gebundener schwefliger Säure im Wein werden aber meist die Additionsverbindungen des Bisulfits mit Aldehyden, Ketonen und Aldehydzuckern verstanden. Diese α -Hydroxisulfonsäuren spalten sich sowohl in saurer, als auch in alkalischer Lösung auf. In saurer Lösung ist die Dissoziation bei Raumtemperatur sehr langsam und abhängig von der jeweiligen Verbindung. Die Aufspaltung nimmt aber mit steigender Temperatur zu und ist beim Erhitzen, bei der Destillation, vollständig erfolgt. In alkalischer Lösung geht die Aufspaltung schon bei Raumtemperatur schnell vonstatten. Es liegen dann nicht mehr die Bisulfitionen vor, sondern die neutralen Sulfite, die nicht mit Aldehyden und Ketonen reagieren (3).

Die gebundene schweflige Säure kann also in neutralen oder sauren Lösungen vor der Aufspaltung nicht mit Jod bestimmt werden. H. S c h a n d e r l (7) konnte die Dissoziation der gebundenen schwefligen Säure in Modellmagensäften beobachten. Er stellte fest, daß durch Erhöhung der Temperatur auf 37°C gebundene schweflige Säure in freie übergeführt wurde. Ferner stellte er fest, daß bei anaciden und subaciden Magensäften mehr Sulfit aus seinen Verbindungen in Freiheit gesetzt wurde, als bei normaciden und hyperaciden Magensäften.

Die pharmakologische Wirkung der schwefligen Säure wurde schon des öfteren untersucht. Die umfassendsten Arbeiten liegen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt in Berlin aus den Jahren 1904 bis 1913 vor (10 - 14). Auf diese Arbeiten stützten sich auch F. E i c h h o l t z (8) und E. S t a r k e n s t e i n (9) bei der Beurteilung der schwefligen Säure als Konservierungsstoff in ihren Lehrbüchern.

G. S o n n t a g (10) beschäftigte sich zunächst mit der Ausscheidung der schwefligen Säure beim Hunde. Er verfütterte neutrales Natriumsulfit und aldehydschweflige Säure an Hunde jeweils 4 Tage lang. Die Dosen für Natriumsulfit betrugen 2,0 bis 6,0 g, wobei er bei der 6,0 g Dosis Erbrechen beobachtete. Von den verfütterten Mengen konnte er nur einen Bruchteil als Sulfit

im Harn nachweisen, und zwar 3,2 bis 4,6%, unabhängig von den eingegebenen Dosen. Aldehydschweflige Säure verfütterte er in Dosen von 1,1 bis 3,2 g. Bei einem Hund konnte er Diarrhoen feststellen. Die ausgeschiedene Sulfitmenge betrug 2,4 bis 3,7%. Er konnte also in der Ausscheidung kaum einen Unterschied zwischen Natriumsulfit und aldehydschwefliger Säure feststellen. Der weitaus größte Teil wird bei beiden als Sulfat ausgeschieden. Eine angestellte Schwefelbilanz zeigte, daß der verfütterte Schwefel vollständig wieder im Harn zur Ausfuhr gelangte.

F. F r a n z und G. S o n n t a g (11) verfolgten darauf die Ausscheidung von schwefliger Säure beim Menschen. Sie konnten in der 2. Viertelstunde nach der Einnahme von Natriumsulfit Sulfit im Harn nachweisen. Die ausgeschiedene Menge betrug aber nur 1% der zugeführten. Bei den organischen Sulfitverbindungen trat eine Verzögerung der Ausscheidung von Sulfit im Harn ein, die im Einklang mit der Zerfallsgeschwindigkeit der jeweiligen Additionsverbindung stand.

Der Ort der Resorption des Sulfits wurde beim Kaninchen verfolgt (12). Es wurde festgestellt, daß die Resorption vom Darm weitaus schneller erfolgte, als vom Magen aus. Doch konnte bei einer überletalen Dosis von Sulfit auch soviel vom Magen resorbiert werden, daß das Tier einer typischen Sulfitvergiftung erlag. Eine Vergiftung mit Sulfit tritt nur bei solchen Lebewesen ein, die nicht zum Brechakt befähigt sind, wie z.B. beim Kaninchen. Die letale Dosis für Kaninchen betrug bei oraler Gabe $0,65 \text{ g SO}_2 / \text{kg Tier}$ (13). Das Sulfit war noch in 3,5 %iger Lösung wirksam. Beim Einspritzen von Natriumsulfitlösungen in die Blutbahn war die tödliche Sulfitmenge abhängig von der Konzentration der Lösung und der Einspritzgeschwindigkeit.

Die Giftwirkung zeigte folgendes Erscheinungsbild:

1. Stadium: Blutdrucksenkung
2. Stadium: Verlangsamung des diastolischen Charakters der Pulse.
3. Stadium: Arythmie bei fast ungeschwächter Herzkraft, Lähmung des Herzmuskels, Herzstillstand in Diastole. Daneben kommt es zur vermehrten Harnabsonderung.

Die schweflige Säure verlor durch ihre Anlagerung an organische Stoffe nichts von ihren giftigen Eigenschaften. Die Anlagerungsprodukte wirkten wie die schweflige Säure selbst, nur die letale Dosis war verschieden. Den Arbeiten von E. R o s t und F. F r a n z (13) wurde folgende Tabelle entnommen:

Einführung von 10%igen Lösungen in den Magen von Kaninchen	L D berechnet als SO ₂
Formaldehydschwefligsaures Natrium	1,3 - 1,85 g
Acetaldehydschwefligsaures Natrium	0,8 - 1,22 g
Natriumsulfit	0,64 - 0,65 g
Acetonschwefligsaures Natrium	0,47 - 0,63 g
Glukoseschwefligsaures Natrium	0,31 - 0,49 g

Versuche am isolierten Kaninchenherzen nach Langendorff zeigten (14), daß die Giftwirkung der schwefligen Säure eine außerordentlich flüchtige ist. Das Herz ging beim Ersatz der Giftlösung durch Ringersche Lösung mehr oder weniger schnell in vollständige Erholung über. Die Giftwirkung am isolierten Herzen äußerte sich in Abnahme des Tonus und in Schlagverlangsamung. Bei hohen Dosen erlosch infolge Herzmuskellähmung die Herztätigkeit. Die organischen Additionsverbindungen unterschieden sich nur durch die Schnelligkeit der Wirkung. Am langsamsten wirkte das formaldehydschwefligsaure Natrium, dann folgten die Acetaldehyd- und Benzaldehydverbindungen, darauf das neutrale Natriumsulfit, die Arabinoseverbindung und am schnellsten wirkte die Glukoseverbindung.

E. R o s t und F. F r a n z (12) untersuchten auch in Selbstversuchen die Wirkungen der schwefligen Säure am Menschen. Nach einmaliger Einnahme von 5,8 g Natriumsulfit = 1,3 g SO₂ trat bei Versuchsperson 1 ein schwerer Magen-Darmkatarrh auf. Die 2. Versuchsperson nahm 4,0 g Natriumsulfit = 0,96 g SO₂ ein. Es kam zu einer unspezifischen Magen-Darmreizung mit Erbrechen, Diarrhoen, Cyanose, Schwindelgefühl und Kopfschmerzen. Bei niedrigeren Dosen wie 1,0 g Natriumsulfit wurde Magendrücken und Aufstoßen beobachtet. Zusammenfassend erklärten die Autoren,

daß die Wirkung der schwefligen Säure bei Mensch und Tier, die zum Brechakt befähigt sind, eine kombinierte Säure - Salzwirkung darstellt. Ein Anhaltspunkt für den Ort der Oxidation des Sulfit im Organismus hatte sich aus ihren Arbeiten nicht ergeben. Rost und Sonntag nahmen an, daß das Sulfit im Magen - Darmkanal einer so raschen Oxidation unterliegt, daß die Verfolgung bis zu den Nieren auf Schwierigkeiten stößt. Ihre Behauptung stützten sie darauf, daß sie nur geringe Mengen von Sulfit im Blut nachweisen konnten. Da sie das Sulfit im Blut durch Herausdestillieren bestimmt haben, wurde ihnen, wie in eigenen Versuchen später noch beschrieben, das Sulfit durch den bei der Destillation abgespaltenen Blutsauerstoff oxidiert und entging so dem Nachweis.

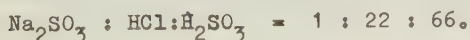
C. J a k o b y und H. W a l b a u m (15) untersuchten die Grenze der Gesundheitsschädlichkeit der schwefligen Säure. Ausgehend von den Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt, nach denen der schwefligen Säure nur eine örtliche Salz - Säure-Wirkung zukommt, untersuchten sie die Reizwirkung der schwefligen Säure. Wässrige Lösungen der schwefligen Säure wurden mittels einer Sonde oder direkt durch Injektion an der narkotisierten, laparotomierten Katze in den Magen und in den Darm eingebracht. Es wurde bei einer 0,3%igen Lösung von schwefliger Säure eine deutliche Ätzwirkung an der Schleimhaut festgestellt. Bei einer 0,2%igen Lösung fehlte der normale Glanz und bei einer 0,1%igen Lösung war der normale Glanz zwar erhalten, aber es fehlte die normale Transparenz. Es wurden ferner Katzen 0,2%ige Lösungen von schwefliger Säure, die gleichzeitig 0,2% an Salzsäure enthielten, um eine Neutralisation zu vermeiden, per os gegeben. 10 mg und 30 mg riefen schon Reizerscheinungen hervor, die von den Autoren durch ein Zittern der Tiere, durch besondere, von Schmerz verursachte, Stellung der Tiere und durch Durchfälle als solche identifiziert wurden. Bei 0,04%igen Lösungen waren 40 und 60 mg von der gleichen Wirkung.

In 34 Versuchen wurden Versuchspersonen 0,05%ige Lösungen von H_2SO_3 , die gleichzeitig 0,2 - 0,3% an HCl enthielten, zu trinken gegeben. Bei 50 mg und sogar bei 25 mg traten unangenehme

Gefühle im Magen, Wärme, Druck, wirkliches Schmerzgefühl, Aufstoßen und Durchfälle auf. In 0,04%igen Lösungen kam es bei 20 und auch 10 mg bei einzelnen Personen zu Kopfschmerzen, Aufstoßen, Übelkeit und Durchfall. Bei der gleichen Gabe Salzsäure allein, waren diese Erscheinungen nicht festzustellen. Die beobachteten örtlichen Reizwirkungen schrieben die Autoren nur der freien schwefligen Säure zu, wobei sie unter freier schwefliger Säure die undissoziierte Säure verstanden, deren Dissoziation sie durch die Zugabe von Salzsäure zurückdrängten. Nach der Darstellung von K. Vas und H. Ingram (2), siehe Abb. 1, existiert die undissoziierte Säure nur im Bereich von pH 4 bis 0, von 0 bis 100% ansteigend. Damit ist anzunehmen, daß bei den Versuchen von Jakoby und Wahlbaum tatsächlich die schweflige Säure zum größten Teil in der undissoziierten Form vorlag. Es ist vielleicht dabei interessant, zu erwähnen, daß nach O. Rahn und L.I. Conn (1) die undissoziierte Säure die stärkere antimikrobielle Wirkung entfaltet. Diese Behauptung konnte von H.J. Rehm und H. Wittmann (16) bestätigt werden. Sie fanden, daß die Wirkung der undissoziierten Säure gegen E.coli 1000 fach, gegen Sacch.cerevisiae 100-500 fach und gegen Aspergillus niger 100 fach stärker ist, als die der HSO_3^- -Ionen. Eine Wirkung der SO_3^{2-} -Ionen konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Die Autoren nahmen an, daß die undissoziierte Säure leichter die Zellmembranen passieren kann, als die Ionen es vermögen. Die Behauptung, daß nur die undissoziierte Säure, von Jakoby und Wahlbaum als freie schweflige Säure bezeichnet, eine Reizwirkung entfaltet, bewiesen sie am Flimmerepithel der Froschmundschleimhaut. Sie untersuchten, bei welchen Konzentrationen von Na_2SO_3 , H_2SO_3 und HCl in physiologischer Kochsalzlösung die Flimmerbewegungen verschwanden und stellten fest, daß die Flimmerbewegungen

bei HCl	0,065%	nach 6 Min.
bei H_2SO_3	0,065% als SO_2	sofort
bei H_2SO_3	0,036% als SO_2	nach 1 Min.
bei H_2SO_3	0,006% als SO_2	nach 48 Min.
bei Na_2SO_3	0,4% als SO_2	nach 48 Min.

aussetzten. In der Wirkung verhielten sich also:



C. J a k o b y (15) befürwortete auf Grund dieser Untersuchungen am Flimmerepithel des Frosches, eine Konzentration von 50 - 60 mg pro Liter an freier schwefliger Säure als Grenzwert für die Zulassung zu nehmen, da diese Menge gerade noch eine Wirkung auf die Flimmerepithelzellen hatte.

Eine Zusammenstellung über die Verträglichkeit der schwefligen Säure für den Menschen gibt K. L a n g (17) in seinem Gutachten über die physiologischen Wirkungen der schwefligen Säure. Er hat die Untersuchungsergebnisse von sieben Autoren zusammengestellt. Wurden Beschwerden nach Einnahme von schwefliger Säure festgestellt, so waren es immer die gleichen: Magenbeschwerden, Durchfälle und Kopfschmerzen. Interessant war der große Unterschied innerhalb der Dosen. Es wurden Dosen von 2 000 bis 650 mg SO_2 symptomlos vertragen, während Dosen von 500 bis 10 mg SO_2 Beschwerden verursachten. Lang schätzt deshalb, daß ca. 10 bis 20% der Konsumenten auf SO_2 mit subjektiven Beschwerden reagieren würden, wenn es zu einer Erhöhung der erlaubten SO_2 -Mengen kommt. Lang stützte sich dabei auf die Untersuchungen von C. J a k o b y und H. W a l b a u m (15), die die Beschwerden bei den niedrigsten Dosen festgestellt hatten. Es sollte vielleicht erwähnt werden, daß Jakoby und Walbaum die einzigen Autoren waren, die die schweflige Säure gleichzeitig mit Salzsäure eingegeben haben.

Die Empfindlichkeit mancher Versuchspersonen gegenüber schwefliger Säure steht im Gegensatz zu den Tierversuchen, die auch in jüngster Zeit angestellt wurden.

M. F. L o c k e t t und I. L. N a t o f f (18) verabreichten 750 ppm (mg/l) SO_2 als Natriummetabisulfit im Trinkwasser an drei Generationen von Ratten, in Experimenten, die beinahe drei Jahre dauerten. Das Metabisulfit war ohne Effekt auf das Wachstum, die Aufnahme von fester und flüssiger Nahrung und der Ausscheidung des Kotes. Es beeinflusste nicht die Fruchtbarkeit, das Gewicht der Neugeborenen und die Laktation, ferner ließ es nicht die Häufigkeit der Tumorbildung ansteigen. Die histologische Prüfung der Organe bei einem Teil der Ratten

nach 10 Monaten des Beginns der Trinkwasserversuche, ergab keine Abnormitäten. M.F. Lockett und I.L. Natoff hatten Kontrollversuche nebenher laufen, bei denen nur reines Wasser als Trinkwasser verabreicht wurde.

Wie schon F. Franz und G. Sonntag (10, 11) beim Hund und beim Menschen festgestellt hatten, daß Sulfit im Harn zum größten Teil als Sulfat ausgeschieden wird, konnten B. Baghat und M.F. Lockett (19) an Ratten bestätigen. 53% des verfütterten Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) wurden innerhalb der ersten vier Stunden nach Eingabe, als Sulfat im Harn ausgeschieden. Dabei wurde ein geringer Anstieg der jodreduzierenden Substanzen im Harn festgestellt. Dieser Anstieg kann einmal auf Sulfit, aber auch auf Thiosulfat zurückzuführen sein. Nach B.H. Sorbo (20) führt die Rattenleber, in der Gegenwart von Sulfit, Merkaptopyruvat schnell und quantitativ in Thiosulfat über. Thiosulfat kommt in kleinen Mengen im Harn von Menschen, Hunden und Katzen immer vor. Der leichte Anstieg an jodreduzierenden Substanzen kann daher auch auf eine, in Gegenwart von Sulfit vermehrte Ausscheidung von Thiosulfat zurückzuführen sein.

B. Baghat und M.F. Lockett verglichen die Ausscheidungen im Harn nach Einführung von Natriummetabisulfit-, Natriumthiosulfat- und Sulfatlösungen mit einer Magensonde und nach der intraperitonealen Injektion der gleichen Lösungen. In den ersten vier Stunden nach der Injektion wurden 80 - 90% des zugeführten Schwefels als anorganisches Sulfat ausgeschieden. Die Form und das Ausmaß der Ausscheidung war bei allen drei Lösungen gleich. Bei jeder Lösung wurden sehr geringe Mengen an jodreduzierenden Substanzen im Harn festgestellt.

Innerhalb der ersten vier Stunden nach Eingabe der Lösungen mit der Magensonde wurden ungefähr 55% der Schwefelmenge vom Metabisulfit, 23% vom Thiosulfat und 7% vom Sulfat im Harn als Sulfat ausgeschieden. Metabisulfit wird also vom gastrointestinalen Trakt schneller resorbiert als Thiosulfat. Sulfat wird nur zu einem geringen Teil resorbiert.

Über den Ort der Oxidation der schwefligen Säure im Organismus wurden umfangreiche amerikanische Arbeiten angestellt.

Diese Arbeiten gingen ursprünglich davon aus, die Oxidation des Schwefels aus den schwefelhaltigen Aminosäuren zu verfolgen. Die biologische Oxidation von Cystein soll z.B. über die Cysteinsulfinsäure, β -Sulfinylbrenztraubensäure zum Sulfit verlaufen (21). Der Mechanismus der Sulfitoxidation war aber noch ungeklärt.

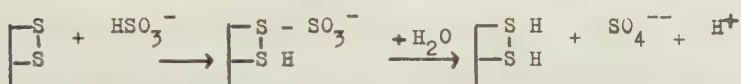
M. Heimberg, I. Fridovich und Ph. Handler (22) gelang die Oxidation von Bisulfit mit Leberpräparaten von Ratten, Schweinen, Mäusen und Hamstern. Die Leberpräparate wurden aus Aceton-Trockenpulvern extrahiert. Sie oxidierten auch eine Reihe von α -Hydroxi-, α -Amino- und N-substituierter α -Aminosulfonsäuren. Wurden bei pH 5,3 die unlöslichen Proteine entfernt, ging die Fähigkeit, die Sulfonsäuren aufzuspalten verloren. Die Sulfitoxidation wurde davon nicht berührt.

In weiteren Untersuchungen stellten I. Fridovich und Ph. Handler (23) fest, daß nur die mitochondriale Fraktion von Organgeweben imstande ist, die Sulfitoxidation zu katalysieren. Nach einer teilweisen Reinigung mit Ammonsulfatfällungen, Protaminfällung und Proteinfällung bei 55°C wurde eine Enzymlösung erhalten, die zwar die Oxidation des Sulfits, aber nicht mehr die der Carbonylverbindungen katalysieren konnte. Nach Säurehydrolyse der Enzymlösung konnte Riboflavin papierchromatographisch nachgewiesen werden.

In weiteren Arbeiten stellten I. Fridovich und Ph. Handler (24) und (25) nach Dialyse der Enzymlösung fest, daß die anaerobe Oxidation von Sulfit inaktiviert wurde. Sie ermittelten als aktives Prinzip das Hypoxanthin. Daraus und aus ihren früheren Ergebnissen schlossen sie, daß der Enzymkomplex die reversible Teilnahme von Hypoxanthin oder Inosin und ein Flavoprotein einschließt.

Sie unterließen darauf die weitere Untersuchung des sulfitoxidierenden Enzyms und wandten sich der Aufklärung des Mechanismus der Sulfitoxidation zu. Sie (26) kamen zu der Annahme, daß

die Sulfitoxidation von einer reversiblen Reduktion und Oxidation einer Disulfidverbindung begleitet wird. Ihre Vermutung stützten sie auf die Hemmung der anaeroben Reduktion von Methylthylblau mit Arsenit und p - Chlormercuribenzoat (p - CMB), einem typischen Sulfhydrylreagenz. Die aerobe Oxidation von Sulfit wurde dagegen nur wenig gehemmt. Ferner ermittelten sie einen Anstieg der Sulfhydrylgruppen nach Zugabe von Sulfit, wenn das Enzym vorher mit p - CMB behandelt wurde. Die Sulfhydrylgruppen wurden mit der B o y e r - Methode (27) bestimmt. Das Enzymsystem war auch in der Lage Cystein und Dimerkaptolipoat zu oxidieren. Die Sulfitoxidation wurde durch Liponsäure gesteigert, durch Cystin, Cysteinthiosulfonat und Thiosulfat gehemmt. Fridovich und Handler nahmen daher für die Sulfitoxidation folgende Reaktionsfolge an, bei der die Liponsäure als Disulfidquelle dienen sollte:



Ausgehend von dem Ergebnis, daß Hypoxanthin als ein obligatorischer Kofaktor für die Oxidation von Sulfit durch das Leberenzym dient, untersuchten I. F r i d o v i c h und Ph. H a n d l e r (28) die Xanthinoxidase = X O . Die Leberpräparate wiesen keine Xanthinoxidase-Aktivität auf. Gereinigte X O aus Milch war ebenfalls nicht in der Lage, die Sulfitoxidation zu katalysieren. Konnte aber die X O auf ein Gemisch von Sulfit und Hypoxanthin einwirken, so gelang es, Sulfit zu oxidieren. Die Behandlung der X O mit Cyanid unterband vollständig die Oxydation von Hypoxanthin, erlaubte aber die Oxidation von Sulfit in Gegenwart von katalytischen Mengen Hypoxanthin, aerob und anaerob. In säurehaltigen Lösungen von pH 7,6 und in Gegenwart von Cyanid wurde die aerobe Sulfitoxidation auch von denaturierter X O katalysiert. Hypoxanthin war dabei nicht erforderlich. Fridovich und Handler schlossen daraus, daß es eine nichtenzymatische (hypoxanthinunabhängige) und eine enzymatische (hypoxanthinabhängige) Katalyse der Sulfitoxidation gibt. Sie nahmen an, daß eine Wechselbeziehung zwischen Sulfit und dem Metall des Enzyms bestehen muß, und Hypoxanthin dabei die Rolle des Elektronentransportes übernimmt.

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der Sulfitoxidation prüften I. Fridovich und Ph. Handler (29) die katalytischen Wirkungen von Fe II- und Fe IIIsalzen auf die Sulfitoxidation. FeIIsalz war der bessere Katalysator. Die leichte katalytische Aktivität des FeIIIsalzes konnte auf eine geringe Reduktion des Fe III zum Fe II durch Sulfit zurückzuführen sein, Fridovich und Handler nahmen an, daß an der aktiven Seite der XO_2 Moleküle Flavin-adenosin-dinucleotid sitzen, die durch zwei eisenhaltige Merkaptogruppen verbunden sind. Die Eisenatome sollen dabei Elektronen von einem Flavin-adenosin-dinucleotid-Molekül zum anderen übertragen. Da die angenommene Elektronentransportfunktion des Eisens eine vorübergehende Existenz des Fe II-Stadiums einschließt, schien es möglich, daß dieses Fe II-Ion direkt mit O_2 reagiert und ein O_2 -Radikal wie folgt produziert:



Dieses Sauerstoffradikal könnte gut die Sulfitoxidation auslösen, und die Oxidation des Sulfits wäre somit eine Kettenreaktion.

Bernsteinsäure - Dehydrogenase aus Rinderherzmitochondrien

Glucose - Oxidase

D - Aminosäure - Oxidase

Milchsäure - Dehydrogenase

Alkohol - Dehydrogenase und

Urease

vermochten die Sulfitoxidation nicht auszulösen. Dies steht im Einklang damit, daß diese Enzyme nicht direkt mit Sauerstoff reagieren können.

Ausgehend von der Hypothese, daß die Oxidation von Sulfit durch Xanthinoxidase eine Radikalkettenreaktion ist, untersuchten I. Fridovich und Ph. Handler (30) noch weitere Enzyme. Sie waren jetzt überzeugt, daß eine enzymatische Sulfitoxidation nur erfolgt, wenn im Laufe der Reaktion freie Radikale entstehen. Ein Molekül H_2O_2 oxidierte nämlich nur 3 Sulfitationen, während in Gegenwart von Xanthinoxidase und Xanthin 10 000 Sulfitationen oxidiert wurden, pro Molekül Xanthin.

L - Aminosäure - Oxidase

Pilztyrosinase

Katalase

Cytochrom - Oxidase und

Ferrocyclochrom c

waren nicht imstande Sulfitoxidation zu katalysieren. Eine Oxidation von Sulfit wurde von folgenden Enzymen eingeleitet:

Xanthin - Oxidase aus Kalbsleber

Kaninchen-Leberaldehyd-Oxidase mit N-Methylnikotinamid als Substrat

Azid - Katalase, in Gegenwart von H_2O_2

Rettich - Peroxidase, in Gegenwart von H_2O_2 mit einem von H_2O_2 oxidierbaren Substrat wie Phenol

Cytochrom - Oxidase, bei der aeroben Oxidation von Ferrocyclochrom c

Lipoxidase in Gegenwart von Linolsäure und

Kaninchenlebermikrosomen in Gegenwart von reduziertem Triphosphopyridinnucleotid (TPNH).

Von den untersuchten Flavoproteinen leiteten nur die Xanthinoxidase der Milch, der Kalbsleber und die Aldehydoxidase der Kaninchenleber die Sulfitoxidation ein. Fridovich und Handler führten dies auf die Möglichkeit zurück, daß die metallischen Komponenten der Enzyme in einem gewissen Ausmaß direkt den Elektronentransport zum Sauerstoff übernehmen.

Nachdem M. Heimb erg, I. Fridovich und Ph. Handler (22) ein Enzymsystem in der Leber gefunden hatten, das imstande war, die Sulfitoxidation zu katalysieren und I. Fridovich und Ph. Handler sich der Aufklärung des Reaktionsmechanismus widmeten und dabei noch weitere Enzyme ermittelten, die Sulfit oxidieren bzw. die Oxidation katalysieren konnten, beschäftigten sich R.M. MacLeod, W. Farkas, I. Fridovich und Ph. Handler (31) eingehender mit der Reinigung und den Eigenschaften der Lebersulfitoxidase. Die Reinigung der Sulfitoxidase, extrahiert aus Rattenleber - Acetontrockenpulver, Rinderleber - Acetontrockenpulver und Hundeleber wurde

beschrieben. Die Reinigung war differenzierter, als die früher von M. H e i m b e r g et al. angegebene und schloß z.T. eine Absorption an Calciumphosphatgel und eine Auftrennung über Zellouloseklen ein.

Das gereinigte Enzym katalysierte die Oxidation von Sulfit in Gegenwart von verschiedenen Elektronenakzeptoren : O_2 , Cytochrom c, Ferricyanid und 2,6-Dichlorphenol-indophenol. Die Reduktion von Cytochrom c, Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenol-indophenol wurde spektralphotometrisch verfolgt, korrigiert durch die Ergebnisse für die nichtenzymatische Reduktion durch Sulfit. An der Reduktion des Cytochrom c wurde die Substratspezifität des Enzyms untersucht. Sulfit konnte nicht ersetzt werden durch D P N H, T P N H, Succinat, Thiosulfat, Dithionat, Cysteinsulfonat, Cysteinthiosulfat, Lactat, Acetaldehyd, Hypoxanthin oder Selenit. Mit Sulfit als Substrat katalysierte Rinderleberenzym die relative Reduktion von Cytochrom c, O_2 , Ferricyanid und Methylenblau wie folgt:

$$100 \quad : \quad 114 \quad : \quad 1420 \quad : \quad 6,7.$$

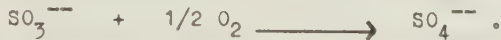
Das gereinigte Enzym war unter pH 7,0 unstabil, aber ganz stabil zwischen pH 7,0 und 9,5. Durch Dialyse verringerte sich die Aktivität. Die K_m = Michaeliskonstante für Sulfit betrug beim Rinderleberenzym $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, beim Hundeleberenzym $2,7 \cdot 10^{-5}$ M.

Die Cytochrom c - Reduktion wurde gehemmt durch Ag^+ , Hg^{++} und p-CMB. Hemmung mit Thiosulfat konnte durch Dialyse rückgängig gemacht werden. Hemmung mit Trypsin variierte mit dem verwendeten Elektronenakzeptor.

Das Enzym von Rinder-, Hund- und Rattenleber hatte das gewöhnliche Absorptionsmaximum der Proteine bei 280 nm und einen zusätzlichen Peak bei 413 nm. Anaerobe Zugabe von Sulfit verschob diesen auf 423 nm. Rinderenzym hatte nach Zugabe von Sulfit zwei neue Absorptionsmaxima bei 528 und 556 nm. In allen Fällen hob Belüftung die spektralen Veränderungen auf. Das Absorptionsspektrum des mit Sulfit behandelten Rinderenzym\$glich vollständig dem, von reduziertem Cytochrom b_5 . Cytochrom b_5 ließ sich aber nicht durch Sulfit reduzieren, noch hatte es Sulfit-oxidase-Aktivität. Ferner konnte Cytochrom b_5 , Cytochrom c als Elektronenakzeptor nicht ersetzen.

Das Rinderleberenzym wurde in der Ultrazentrifuge untersucht. Es wurde festgestellt, daß Sulfitoxidase-Aktivität und ein rotes Protein zusammen sedimentierten. In diesem rot gefärbten Protein wurde nach Abspaltung der Eiweißkomponente und nach Reduktion Protohäm in nachgewiesen.

Bei der aeroben Sulfitoxidation war der O_2 -Verbrauch und der Sulfitverbrauch stöchiometrisch nach der Gleichung:



Da Sulfit auch nichtenzymatisch von H_2O_2 oxidiert wird, konnte von der Stöchiometrie nicht darauf geschlossen werden, daß die Reduktion von O_2 durch das Enzym in H_2O_2 resultierte.

Zugabe von Katalase und Aethanol verdoppelten den O_2 -Verbrauch, was die Bildung von H_2O_2 bei der aeroben Wiederoxidierung des reduzierten Enzyms anzeigen sollte.

Verschiedene Gewebe und Zellteile wurden auf ihre Sulfitoxidaseaktivität geprüft. Nach der Separation der Gewebe in Nucleus, Mitochondria und Mikrosomen nach der Methode von W.C. Schneider und G.H. Hogeboom (32), Herstellung eines Aceton-Trockenpulvers und Extraktion desselben mit Pufferlösung, wurde die größte Sulfitoxidase-Aktivität in der Mikrosomenfraktion gefunden. Es war merkwürdig, daß vor der Herstellung des Aceton-Trockenpulvers die Aktivität der Mikrosomenfraktion nur sehr gering war. Von den Geweben waren Leber, Niere, Herz reich an Aktivität, während Gehirn, Hoden, Lunge und Milz relativ wenig Aktivität aufwiesen. Diese Ergebnisse stimmten mit dem Cystein-Desulfinikase-Vorkommen überein, das groß in der Leber und in der Niere ist und gering im Gehirn. Cystein-Desulfinikase stellt die Quelle des Sulfits im Säugetierstoffwechsel dar.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß R.M. MacLeod et al. ein Enzym gefunden haben, das Sulfit oxidiert. Ob Sulfit das alleinige Substrat ist, ist nicht sicher, aber wahrscheinlich. Das Enzym ist ein Hämoprotein, dessen Absorptionsspektrum

vergleichbar ist mit dem von Cytochrom b_5 . Da bei der Oxidation von Sulfit H_2O_2 gebildet wird, kann eine Flavín- oder hydrochinoide Gruppe an der Reduktion des Sauerstoffes teilnehmen. Eine nichtenzymatische, metallkatalysierte Radikalkettenreaktion, wie sie bei der Autoxidation von Sulfit stattfindet, wird als unwahrscheinlich angesehen. Dieser Prozeß erfordert für die effektive Ausbreitung der $SO_3^{---}O_2$ -Kettenreaktion eine relativ hohe Konzentration an Sulfit (10^{-3} M). Sie tritt auch nicht leicht in lebenden Geweben auf, da dort zuviel Kettenbrecher vorhanden sind.

I. F r i d o v i c h und Ph. H a n d l e r (29) hatten aber festgestellt, daß Xanthinoxidase, wenn sie auf ihre Substrate einwirkt, die Autoxidation von Sulfit in einer freien Radikalkettenreaktion auslösen kann. R.M. MacL e o d , I. F r i d o v i c h und Ph. H a n d l e r (33) untersuchten deshalb nochmals den Mechanismus für ihre, aus der Leber isolierten, anscheinend sulfit-spezifischen Oxidase. Die extrem rasche aerobe Sulfitoxidation durch Leberextrakte konnten sie auf Grund ihrer Untersuchungen so erklären: Sulfitoxidase im nur teilweise gereinigten Leberextrakt oxidiert Sulfit unter gleichzeitiger Bildung von H_2O_2 . Hämoglobin, das auch in dem Extrakt noch erhalten ist, besitzt peroxidative Aktivität. Wie Peroxidase in der Gegenwart von Peroxiden und peroxidierbaren Substrat, erzeugt es reaktive Radikale, die eine schnelle Kettenreaktion zwischen Sulfit und O_2 auslösen können. Dies wurde bewiesen durch Zugabe von peroxidierbaren Komponenten, durch welche die Sulfitoxidation gesteigert wurde. Kettenbrecher wie Mannitol, Cystein und Ascorbat hemmten die Sulfitoxidation.

Ferner widerlegten sie die frühere Behauptung, daß Hypoxanthin als Kofaktor bei der Oxidation von Sulfit durch Leberenzym dient. Es wurde nachgewiesen, daß in dem grob gereinigten Hundeleberpräparat eine geringe Xanthinoxidase-Aktivität vorhanden ist. Xanthinoxidase aber löst, wenn sie auf ihre Substrate einwirkt, eine freie Radikalkettenreaktion durch Bildung eines Perhydroxylradikals zwischen SO_3^{---} und O_2 aus, sofern die Sulfitkonzentration groß genug ist, um die Kettenreaktion aufrechtzuerhalten.

Bei der anaeroben Methylenblau-Reduktion durch Xanthinoxidase und Sulfit, bei der Hypoxanthin auch erforderlich war, ließ sich dies auf die Gegenwart von Restsauerstoff zurückführen. Dieser Restsauerstoff verhinderte die Bildung von Leukomethylenblau. Bei Anwesenheit von Sulfit und Hypoxanthin löste Xanthinoxidase eine Kettenreaktion aus, bei der der Restsauerstoff schnell verbraucht wurde, und Methylenblaureduktion erfolgen konnte. Für die Sulfitoxidase ist also die Anwesenheit von Hypoxanthin nicht erforderlich. Es wird angenommen, daß die Kettenreaktion nur eine künstliche Reaktion des isolierten Systems ist. Im lebenden Gewebe scheinen die relativ niedrige Sulfitkonzentration und die hohe Konzentration an Kettenbrechern kettenfortpflanzende Radikale nicht zu erlauben.

G. P f l e i d e r e r , D. J e c k e l und Th. W i e - l a n d (34) haben festgestellt, daß die Natriumsalze der schwefligen Säure imstande sind, die Tätigkeit von isolierten Dehydrogenasen zu hemmen. Die Hemmungsteste wurden an Laktatdehydrogenase, Alkoholdehydrogenase und Äpfelsäuredehydrogenase mit positivem Ergebnis ausgeführt. Die Hemmung soll auf der Addition von Sulfit an Diphosphopyridinnucleotid (DPN) beruhen. Das Addukt soll eine Hydropyridin-4-sulfonsäure sein. Pfeleiderer konnte nachweisen, daß das Sulfit zusammen mit D P N an das Protein gebunden wird. Das Addukt hat im Gegensatz zu D P N eine Absorption bei 320 nm. Diese Absorption ist bei verdünnten Lösungen nicht zu beobachten, da dann das Addukt in seine Komponenten dissoziiert ist. Bei Zugabe von Enzym taucht bei 320 nm die Absorptionsbande des Adduktes auf, deren Intensität proportional der Enzymmenge zunimmt.

Nach D. H e B hemmt Sulfit auch die Polyphenoloxidase (35). Der Wirkungsmechanismus ist nicht bekannt. Die Hemmung ist aber reversibel, und das Sulfit wird dabei nicht oxidiert.

J.J. H a m b u r g e r und M.A. J o s l y n (36), K.H. B u s i n g und W. R a a b e (37), A.F. M o r g a n et al. (38) stellten fest, daß Sulfit die Autoxidation von Ascorbinsäure in Zitrusfrüchten und getrockneten Früchten verhindert. Sulfit dient also als ein Stabilisator für Vitamin C.

Schweflige Säure und Sulfite zerstören Vitamin B₁.

Nach R.R. W i l l i a m s et al. (39), E.R. B u c h m a n (40) beruht die Zerstörung des Vitamin B₁ auf einer Spaltung des Thiamins in 4-Methyl-5-hydroxiaethyl-thiazol und der Sulfonsäure von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidin. Diese Spaltung ist bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 5,0 innerhalb von 24 - 48 Stunden vollständig. Sie nimmt aber bei tieferen pH-Werten langsam ab.

M. F. L o c k e t t (41) konnte bei einer oralen Gabe von 350 ppm SO₂ in einem Fruchtsirup mit einer täglichen Dosis von 0,5 ml pro 150,0 g Rattenleibengewicht keine Aneurinmangelerscheinung in der Entwicklung der Ratten feststellen.

Eine Übersicht über die chemischen Eigenschaften und die bisher bekannten Wirkungen der schwefligen Säure und ihrer Salze bei der Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie geben M.A. J o s l y n und J.B.S. B r a v e m a n (3).

Z u s a m m e n f a s s u n g

Über die pharmakologische Wirkung der schwefligen Säure läßt sich anhand der bisher veröffentlichten Arbeiten sagen, daß sie hauptsächlich eine örtliche Reizwirkung entfaltet. Dazu muß sie aber nach C. J a k o b y und H. W a l b a u m (15) als undissoziierte Säure vorliegen. Dies kann bei einem normalen Magensaft mit einem absoluten pH-Wert von 1 - 2 (42) zum Teil eintreten. Oberhalb von pH 4 liegt keine undissoziierte Säure und damit keine Reizwirkung mehr vor (2) und (15). F. F r a n z und G. S o n n t a g (12) wiesen nach, daß neutrales Sulfit vom Darm, aber auch vom Magen resorbiert werden kann. Das Ausscheidungsprodukt von Sulfit war zu 95% anorganisches Sulfat. Nach den Untersuchungen von B. B a g h a t und M.F. L o c k e t t (19) wird der größte Teil von Sulfit im Rattenorganismus innerhalb von 4 Stunden oxidiert und erscheint als Sulfat im Harn. Bei einem Vergleich von per os gegebenen und durch intraperitoneale Injektion applizierten Natriummetabisulfit wurde ermittelt, daß ungefähr nur die Hälfte des per os

gegebenen Sulfit im gastrointestinalen Trakt resorbiert wurde. Die andere Hälfte wurde wahrscheinlich schon vor der Resorption im Magen - Darmtrakt oxidiert.

Dabei verhielt sich die gebundene schweflige Säure ähnlich der freien. H. S c h a n d e r l (7) hatte festgestellt, daß im anaciden und subaciden Magensaft die Additionsverbindungen zum Teil aufgespalten werden. Bei der Feststellung der LD 50 von verschiedenen Sulfitverbindungen beim Kaninchen (13) wurde eine Abhängigkeit von der jeweiligen Stabilität dieser Verbindungen beobachtet.

Es wurde auch mitgeteilt (22, 23), daß es in der Leber Enzyme gibt, die fähig sind, Sulfonsäuren aufzuspalten. Dies steht im Einklang damit, daß die LD 50 für glucoseschwefligsaures Natrium niedriger lag als für Natriumsulfit selbst, von dem wahrscheinlich schon ein Teil im Magen - Darm oxidiert worden war.

Als Ort der Oxidation im Organismus ermittelten amerikanische Autoren (22 - 33) die Mikrosomenfraktion von Leber, Niere und Herz. Daraus stellten sie ein Enzymsystem her, das bei Anwesenheit von verschiedenen Elektronenakzeptoren die Oxidation von Sulfit katalysierte. Dieses Enzymsystem nannten sie Sulfitoxidase, da es substratspezifisch zu sein schien. Es soll aus einem Hämoprotein und wahrscheinlich einer Flavin- oder hydrochinoiden Gruppe bestehen. Die Beschreibung des Enzymsystems erinnert sehr an die Enzyme der Atmungskette, die ihren Sitz in den Mitochondrien haben (43).

Die Oxidation von Sulfit durch andere Enzyme soll eine, von diesen katalysierte, Kettenreaktion sein, die nur im isolierten, künstlichen System vorkommt. Im natürlichen Gewebe sei eine Kettenreaktion wegen des niedrigen Sulfitgehaltes und der anwesenden Kettenbrecher nicht anzunehmen.

Nach den bisherigen Untersuchungsergebnissen wird also ein Teil der freien schwefligen Säure und die gebundene schweflige Säure, bei letzterer kann eine teilweise Aufspaltung im gastrointestinalen Trakt vorausgehen, vom Magen-Darmtrakt aufgenommen.

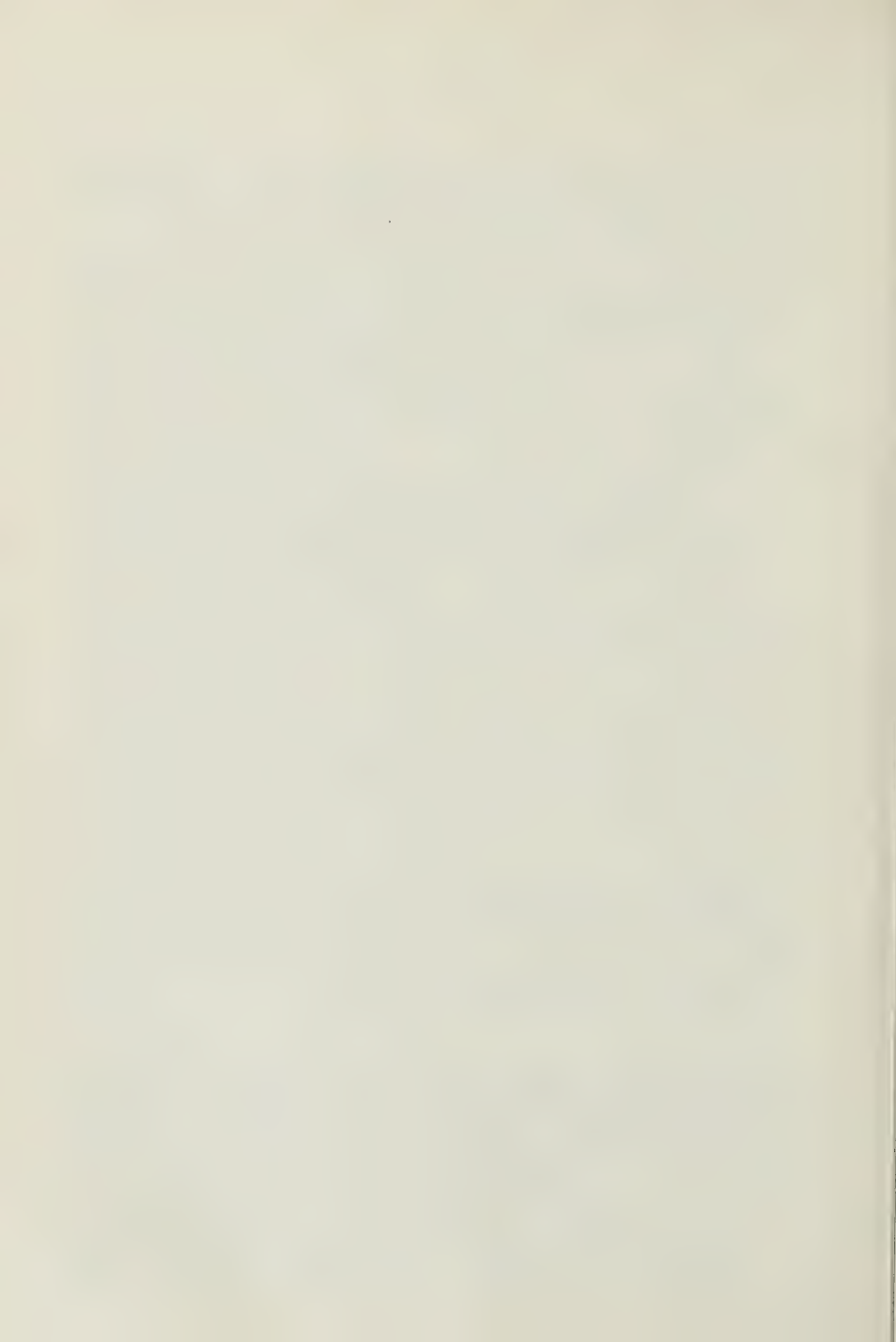
Der andere Teil wird wahrscheinlich im Magen/Darm oxidiert, und da Sulfat schwer resorbiert wird, direkt ausgeschieden. In der Leber kann ein weiterer Teil oxidiert werden, und die Sulfonsäuren können aufgespaltet werden. Da es sich bei dem sulfitoxidierenden Enzym um ein Enzym handelt, das die natürlichen, aus dem Abbau der schwefelhaltigen Aminosäuren stammenden, Mengen Sulfit oxidiert, kann es sein, daß die Oxidationskraft der Leberenzyme nicht ausreicht, um alles resorbierte Sulfit sofort zu oxidieren. Es kann daher überschüssiges Sulfit in den Kreislauf und in die einzelnen Organe gelangen, von denen Herz und Nieren ebenfalls sulfitoxidierende Eigenschaften haben. Obwohl beim Menschen durch die, den Brechakt auslösende Wirkung des Sulfits, keine tödliche Vergiftung eintreten kann, und die Sulfitwirkungen, wie am isolierten Froschherz beobachtet, sehr schnell reversibel sind, so wurden doch, individuell verschieden, Beschwerden wie Magen- und Kopfschmerzen nach dem Genuß von geschwefeltem Wein und der Einnahme von Sulfit beobachtet. Außer der Hemmwirkung der schwefligen Säure auf einige Dehydrogenasen, der Zerstörung von Vitamin B₁, der Herabsetzung der bakteriziden Kraft des Blutes (44), der Beeinflussung des Glucosegehaltes des Blutes (45) und der allgemeinen Spaltwirkung des Sulfits auf Disulfidbrücken sind keine effektiven physiologischen Wirkungen der schwefligen Säure bekannt.

Da die schweflige Säure als Reduktionsmittel alle Reaktionen derselben gibt, ist ihr Nachweis in biologischen Materialien schwierig, und eine Isolierung daraus ist ohne die Zerstörung der physiologischen Bedingungen nicht möglich. Dies erschwert die Beurteilung der Wirkung der schwefligen Säure im Organismus.

In folgender Arbeit sollte untersucht werden, welche Mengen an schwefliger Säure im Magen und Darm oxidiert werden können und welche von Leber- und Blutpräparaten. Ferner sollte untersucht werden, ob die schweflige Säure irgendwelche Veränderungen in den untersuchten Materialien hervorruft.

Die Hemmung der Lactat - Dehydrogenase durch Sulfit sollte auf die Möglichkeit hin untersucht werden, geringe Mengen an Sulfit quantitativ direkt mit dem Hemmungstest zu bestimmen.

EXPERIMENTELLER TEIL



1. Angewandte Methoden

Zur Bestimmung der schwefligen Säure in biologischen Flüssigkeiten wurden von der Universitätsklinik Frankfurt am Main Magensaft, Duodenalsaft und Blut freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die dabei pro Untersuchungsperson durch Ausheberung erhaltenen Mengen an Magen- oder Duodenalsaft betrugen maximal 10,0 ml. Diesen Flüssigkeiten wurde Sulfit zugesetzt und nach einer bestimmten Inkubationszeit bei 37°C die noch vorhandene Sulfitkonzentration bestimmt. Der Zusatz an Sulfit zu diesen verfügbaren kleinen Mengen mußte in einem, für die normalen Bedingungen zutreffendem Verhältnis stehen. Dies erforderte eine Methode, die es erlaubte, mit kleinen Mengen Untersuchungsflüssigkeit auszukommen, und die auch geringe Mengen Sulfit noch quantitativ erfaßte.

Dafür waren weder die jodometrischen Methoden nach M. R i p - p e r (46) und W. D i e m a i r , J. K o c h und D. H e ß (47), die gravimetrischen Methoden nach G.W. M o n i e r - W i l l i a m s (48) und S. R o t h e n - f u s s e r (49), die alkalimetrischen nach F. F r a n z und G. S o n n t a g (11) und I.F. R e i t h und J.J.L. W i l l e m s (50), noch die kompleximetrischen nach H. W i l s o n et al. (51) und R e i t h - W i l l e m s (50) zu verwenden.

G. P f l e i d e r e r (34) war es gelungen, die Aktivität der Laktatdehydrogenase (L D H) aus Herzmuskel mit Mengen von $< 2 \mu$ Sulfit zu 25% zu hemmen. Dies erschien als eine Möglichkeit, geringe Sulfitmengen aus wenig Untersuchungsflüssigkeit zu bestimmen, sofern es gelang, die Hemmung quantitativ zu verfolgen. Es gibt verschiedene Laktatdehydrogenasen. Ihre Zusammensetzungen hängen davon ab, in welchem Organ sie vorkommen. Die L D H aus Schweineherzmuskel besteht nach der elektrophoretischen Auftrennung aus einer Komponente. Die Phosphatanalyse ergab 2 Moleküle Phosphat pro Molekül Enzym (52). Die L D H enthält drei direkt reagierende SH - Gruppen (mit p-CMB bestimmt) und

6,5 bis 7,5 SH - Gruppen (durch argentometrische Titration bestimmt) insgesamt pro Molekül Enzym. Es konnte kein Zink nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt 126 000 bis 135 000 (53).

Die Herzmuskel - L D H soll zu den Globulinen gehören, da sie bei der Dialyse gegen salzfreies Wasser ausflockt (54).

Lactatdehydrogenasen katalysieren die Reaktion



D P N = Diphosphopyridin-nucleotid

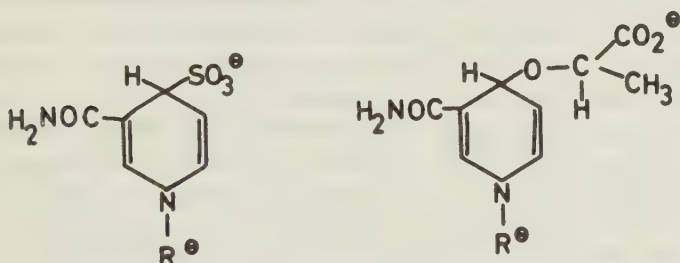
D P N H = reduziertes Diphosphopyridin-nucleotid

wobei das Gleichgewicht weit auf der Seite von Lactat und D P N liegt, so daß man zu Aktivitätsmessungen immer den umgekehrten Vorgang benutzt (55).

G. P f l e i d e r e r (34) hatte nachgewiesen, daß die Brenztraubensäurehydrierung durch Sulfit hemmbar ist. Er stellte fest, daß die Hemmung auf die Anwesenheit von kleinen Mengen D P N im enzymatisch reduzierten D P N H zurückzuführen ist. Sulfit ist in der Lage, mit dem D P N ein Anlagerungsprodukt zu bilden. Dieses Addukt hat im Gegensatz zu D P N ein Absorptionsmaximum bei 320 nm. In verdünnten Lösungen von 2×10^{-4} M an Sulfit und 5×10^{-5} M an D P N ist diese Verbindung dissoziiert. Pfeleiderer konnte nach Zugabe von kristallisierter L D H dieses Addukt bei 320 nm sichtbar machen und zwar nahm die Absorptionsbande proportional mit steigender Enzymmenge zu. In einer späteren Arbeit wies er nach (54), daß drei D P N - Sulfit Moleküle an ein Enzymmolekül gebunden werden.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Sulfithemmung (56) wurde das Enzym mit D P N - Sulfit vorbehandelt und anschließend einer Hitze- und Harnstoffdenaturierung und einer Proteolyse unterzogen. Die Vorbehandlung des Enzym resultierte in einer erhöhten Stabilität gegenüber den durchgeführten Denatu-

rierungsversuchen. D P N , Sulfit, D P N H oder D P N H und Sulfit hatten keinen Effekt. Die Sulfithemmung erwies sich als kompetitiv gegenüber L (+) - Lactat. Mit steigenden Mengen Lactat wurde die Sulfithemmung verringert. Man nahm an, daß die Milchsäure das Sulfit aus seiner Bindung an das D P N - Molekül verdrängt. Sulfit und Lactat werden in 2 oder 4 Stellung vom Pyridinring gebunden, und es wird angenommen, daß die Hydroxylgruppe des Lactats zur Bindung benutzt wird.



Die Carboxylgruppe soll zur Haftung an das Enzym gebraucht werden. Die anionische Haftstelle des natürlichen Substrates scheint also vom Sulfonatanion des Hemmstoffes blockiert zu werden. Durch Sulfit wurden auch nur solche Dehydrogenasen gehemmt, deren Substrat benachbart zum Angriffspunkt, eine saure Gruppe enthielten, wie Apfelsäure-, Glutaminsäure-, Isocitronensäure- und Glycerophosphat-Dehydrogenasen, mit Ausnahme der Leberalkohol-Dehydrogenase.

Bei der Untersuchung von Lactat-Dehydrogenasen aus verschiedenen Organen der Ratte (57) wurde bei jeder LDH eine Übereinstimmung in der Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese, in dem Brenztraubensäure-Optimum und in der Hemmbarkeit durch Sulfit festgestellt.

Die zum Hemmungstest erforderliche Lactat-Dehydrogenase wurde nach einer modifizierten Methode von F.B. S t r a u b (58) aus Schweineherzen isoliert.

Frisch geschlachtete Schweineherzen wurden vom Fett, vom Bindegewebe und Adern befreit und im Starmix mit der vierfachen Menge an kaltem Wasser zerkleinert. Nach der Extraktion unter 30 Minuten langem kräftigen Rühren wurden die wasserlöslichen Proteine an Calciumphosphatgel adsorbiert. Das Calciumphosphatgel wurde nach D. K e i l i n und E.F. H a r t r e e (59) hergestellt. Die Proteine wurden vom abzentrifugierten Gel mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,2 nach Sørensen gelöst, und mit Ammonsulfat bei 0,6 Sättigung gefällt und wieder in Phosphatpuffer gelöst. Nach einer Acetonfällung bei 0°C wurde der Niederschlag in 0,3 gesättigter Ammonsulfatlösung suspendiert. Nach dem Abzentrifugieren von denaturiertem Protein wurde mit festem Ammonsulfat die LDH ausgefällt. Nach einer Umkristallisierung und Suspendierung der erhaltenen Kristalle in 0,5 gesättigter Ammonsulfatlösung wurde die LDH bei 0°C aufbewahrt.

Die Proteinmenge wurde mit dem B i u r e t t e s t (60) bestimmt. 0,1 ml Enzym wurde mit 1,6 ml Wasser und 0,3 ml Trichloressigsäure (49%ig) versetzt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand abgegossen und das Sediment in 5,0 ml Biuretreagenz gelöst. Mit Wasser wurde in einen 10,0 ml Meßzylinder übergespült und auf 10,0 ml aufgefüllt. In 2 cm Küvetten wurde die Extinktion im Eppendorf Photometer bei 546 nm gemessen. In gleicher Weise wurde ein Blindwert, der statt Enzym nur Wasser enthielt, mit 5,0 ml Biuretreagenz hergestellt. Die Proteinmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{Extink. der Probe} - \text{Extink. des Blindwertes}) \times 10 \times 16,5 = \text{mg Protein / ml}$$

wobei 16,5 den Faktor für die LDH darstellt.

Die nach oben beschriebenen Verfahren hergestellte Enzymlösung enthielt 10,25 mg LDH / ml. Dies entspricht einer Ausbeute von 512,5 mg LDH aus 3 kg Schweineherzen.

D P N und D P N H wurden von der Firma Boehringer in Mannheim bezogen.

DPN und DPNH haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Nach Pfeleiderer (34) stammt dieses vom Pyridiniumteil des Moleküls, nach H.U. B e r g m e y e r (55) vom Adeninteil. Bei der Hydrierung des Pyridinringes von DPN zu DPNH tritt bei 340 nm ein neues Maximum auf, während gleichzeitig das bei 260 nm abnimmt.

Für die Brenztraubensäurelösung wurde das Natriumsalz der Brenztraubensäure (Merck) mit Wasser zu einer 0,1 M Lösung gelöst. Die Brenztraubensäure wird im folgenden mit BTS abgekürzt. Die Sulfitlösungen wurden aus entwässertem Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) hergestellt. Ihr Gehalt an SO_2 wurde jodometrisch überprüft. Als Pufferlösung diente ein M/15 Phosphatpuffer pH 7,2 nach Sörensen. Die Einstellung der Pufferlösung erfolgte mit einem Methrom pH - Meter Type E 196 S.

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser bereitet.

DPN und DPNH sind licht- und wärmeempfindlich, DPNH säure- und DPN alkaliempfindlich. Ihre Lösungen in Puffer wurden täglich frisch hergestellt. Die LDH wurde mit Puffer entsprechend verdünnt. Alle Lösungen wurden während der Messung in Eis aufbewahrt. Nur der Puffer wurde auf 25°C vortemperiert. Die kalten Lösungen wurden in eine Temperierkuvette, die schon den Puffer enthielt, einpipettiert und die Reaktion bei 25°C durchgeführt. Der Testansatz für die Hemmungsversuche hatte folgende Zusammensetzung:

1,9 ml	Phosphatpuffer	pH 7,2	
0,04 ml	DPNH	=	$6,14 \times 10^{-7}$ Mol DPNH
0,03 ml	BTS	=	$3,0 \times 10^{-6}$ Mol BTS
0,03 ml	LDH	=	$4-5 \times 10^{-12}$ Mol LDH

Die spezifische Aktivität betrug für diesen Testansatz am 3. Juli 1962 18 900 Einheiten/mg Protein nach Bücher (60).

Am 7. Januar 1964, also nach 1 1/2 Jahren wurde noch eine spezifische Aktivität von 16 400 Einheiten/mg Protein gemessen. Die Reaktion wurde im Photometer Eppendorf bei 366 nm verfolgt. Es

wurde die Zeit gestoppt, bei der die Extinktion von DPNH um 0,1 abnahm. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Enzyms ausgelöst. Nach dem Durchmischen wurde sofort die Zeit für die Extinktionsabnahme von 0,1 gestoppt. Der Beginn der Stop-
pung erfolgte aber immer bei der gleichen DPNH-Extinktion, d.h. bei der gleichen Konzentration.

Die Enzymaktivität in vorgenannter Testlösung ließ sich im Bereich von $1,56 \times 10^{-9}$ Mol SO_2 bis $1,56 \times 10^{-7}$ Mol SO_2 hemmen, das entspricht 0,1 bis 10^8 SO_2 pro Testansatz.

$1,56 \times 10^{-7}$ Mol SO_2 unterbanden die Reaktion zwischen
 $6,14 \times 10^{-7}$ Mol DPNH,
 $3,0 \times 10^{-6}$ Mol BTS und
 $4-5 \times 10^{-12}$ Mol LDH vollständig.

Es war aber zu beobachten, daß die zur vollständigen Unter-
bindung der Reaktion erforderliche Sulfitmenge vom Alter der DPNH-Lösung und auch vom Alter der DPNH-Substanz abhing. Damit war aber auch der Grad der Sulfithemmung von der DPNH-Lösung abhängig. Es konnte daher keine allgemein gültige Eichkurve für die Sulfithemmung aufgestellt werden, da die Hemmung mit dem Alter der DPNH-Lösung schwankte. Je älter die Lösung oder das DPNH selbst war, desto schlechter war die Reaktion durch Sulfit hemmbar. Es wurde dann für den gleichen Hemmeffekt mehr Sulfit gebraucht. In Extremfällen kam es zu einer geringen Hemmung, die sich auch durch steigende Sulfitmengen nicht erhöhen ließ. Die DPNH-Lösung verlor schon im Laufe einer Meßreihe an Stabilität. Pufferung der Lösung mit Natriumbikarbonat auf pH 8 war ohne Erfolg. Die Überprüfung des Gehaltes der Sulfitlösung ergab, daß der Verlust an Sulfit im Laufe eines Tages sehr gering ist, wenn man die Sulfitlösung ebenfalls in Eis aufbewahrt. Die Verluste an Sulfit waren mit dem Hemmungstest quantitativ gar nicht erfaßbar.

Die Versuche ergaben weiter, daß auch die Enzymlösung an Aktivität abnahm. Dieser Aktivitätsverlust hatte aber keinen Einfluß auf die Sulfithemmung. Das Ausmaß der Hemmung durch Sulfit war gleich, auch in der aktivitätschwächeren Enzymlösung, wenn man die Reaktionsgeschwindigkeit der Hemmung auf die des sulfitfreien Systems bezog.

Eine genau definierbare Abhängigkeit zwischen Alter der DPNH-Lösung und der Hemmung durch Sulfit konnte nicht ermittelt werden. Die Hemmung durch Sulfit ließ sich nur quantitativ ausnützen, wenn man gleichzeitig neben der zu untersuchenden Probe eine Lösung von bekanntem Sulfitgehalt testete.

Bei Aufzeichnung der Extinktionsabnahme pro Minute gegen die Sulfitkonzentration erhält man eine Kurve, die im allgemeinen bis 3 γ an SO_2 steil abfällt, die dann, allmählich flacher werdend, wenn die völlige Blockierung des Systems eintritt, einer Titrationskurve ähnelt (Abb. 2). Die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit sind nur bis zu 3 - 5 γ SO_2 groß genug, um eine quantitative Sulfitbestimmung abzuleiten. Eine Transformierung der Kurve in eine Gerade war auch im logarithmischen Maßstab nicht möglich. Trägt man aber nach H.M. R a u e n (61) die Restaktivität gegen die Sulfitkonzentration auf, erhält man bis zu einer Sulfitkonzentration von ca. 5 γ SO_2 im Testansatz eine Gerade (Abb. 3).

$$\text{Restaktivität} = \frac{v_1}{v} = \frac{\text{Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors}}{\text{Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor}}$$

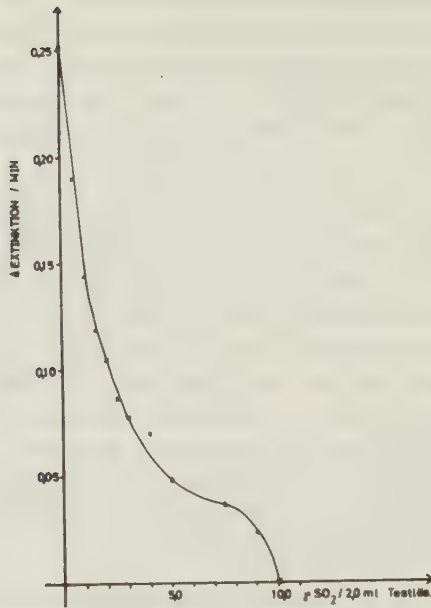


Abb. 2 Extinktionsabnahme von DPNH / Minute bei Anwesenheit von 0 - 10,0 μ SO₂ in einem Testansatz von 2 ml.

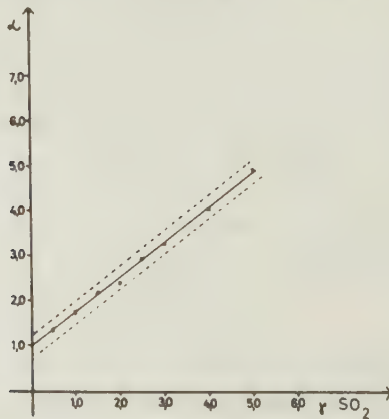


Abb. 3 Eichgerade für die LDH-Hemmung durch Sulfit
Abszisse: Sulfitkonzentration in μ SO₂
Ordinate: Restaktivität α
Gestrichelte Linien: Fehlerbreite der Mittelwerte

Die Standardabweichung der Mittelwerte von verschiedenen Eichkurven wurde nach folgender Formel (62) berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - x_2)^2}{2 M}}$$

Bei 8 Mittelwerten wurde eine Standardabweichung von

$$s = 0,19 \mu \text{ SO}_2 \text{ abs.}$$

errechnet. Der Vertrauensbereich der Mittelwerte bei einer angenommenen statistischen Sicherheit von 95% ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\Delta \bar{x} = \frac{t \cdot (P, n) \cdot s}{\sqrt{N_j}}$$

Es wurde ein Streubereich von $\Delta \bar{x} = 0,31 \mu \text{ SO}_2 \text{ abs.}$ errechnet. Die Methode arbeitet also mit einer Empfindlichkeit von $0,31 \mu \text{ SO}_2$. Danach können nur Sulfitmengen ab $0,31 \mu$ pro Testansatz sicher erfaßt werden.

Der Hemmstoff kann in den Testansatz, wenn man ein konstantes Endvolumen von 2,0 ml hält, in Mengen von 0,005 bis 0,5 ml einpipettiert werden. Es empfiehlt sich aber, die Hemmstofflösung vorher zu neutralisieren, damit die Pufferwirkung nicht aufgehoben wird. So können mit der Hemm-Methode 3 - 200 ppm SO_2 (ppm = mg/l) direkt erfaßt werden.

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Methode wurden einige Beleganalysen durchgeführt.

Tab. 2

Probe	Vorgelegte SO_2 -Menge in ppm	Gefundene SO_2 -Menge in ppm
1	5,0	4,75
2	20,0	22,4
3	25,0	25,5
4	45,0	37,8
5	65,0	64,0
6	75,0	84,8
7	90,0	90,0
8	100,0	110,8

Es wurde die Standardabweichung für Proben verschiedenen Gehaltes nach folgender Formel

$$s = \sqrt{\frac{\sum \sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{N - M}}$$

berechnet. Dies ergab bei 8 Proben mit 24 Einzelmessungen eine Standardabweichung von $s = 5,26$ ppm SO_2 abs. mit einem Streubereich bei 95%iger Sicherheit von $\Delta x = 11,15$ ppm SO_2 abs. Der Fehler ist mit 11,15 ppm sehr hoch. Das Verfahren ist aber reproduzierbar, da die vorgegebenen Mengen innerhalb der Fehlergrenze liegen.

Für die Bestimmung von kleinen Mengen Sulfit in biologischen Materialien ist die Methode neben der großen Fehlerbreite zu unempfindlich. Die Untersuchungslösungen mußten daher konzentriert werden. Es galt, eine günstige Form der Anreicherung zu finden. Bei der Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten konnte eine direkte Bestimmung sowieso nicht vorgenommen werden, da die Lösungen gefärbt und eiweißhaltig waren. Es mußte das SO_2 in Freiheit gesetzt werden. Zur quantitativen Austreibung des SO_2 konnte nur die saure Destillation benutzt werden. Zur Destillation wurde eine 1 : 10 verkleinerte Reith-Willems Apparatur (Abb. 4) benutzt. Die Kühlerlänge betrug 30,0 cm. Ein kürzerer Kühler konnte nicht benutzt werden, so wurde bei einem 18,0 cm langen Kühler kein quantitativer Übergang von SO_2 erhalten. Als Vorlage dienten 3,0 ml mit Eis gekühlte N/10 Natronlauge. In den Destillationskolben wurden 10,0 ml bidestilliertes Wasser gebracht und durch die ganze Apparatur 10 Minuten lang Stickstoff geleitet, der vorher eine Lösung von Anthrachinon- β -sulfonsaurem Natrium passierte. Darauf wurde die Untersuchungsprobe eingefüllt, ev. mit Silikon-Antischaummittel versetzt, mit 3,0 ml verdünnter Salzsäure angesäuert und im Stickstoffstrom eine Stunde lang destilliert. Die Durchperlgeschwindigkeit des N_2 mußte 70 - 90 Perlen pro Minute betragen, damit das SO_2 quantitativ überging. Die Vor-

lage wurde in ein 5 oder 10 ml Meßkülbchen mit Wasser über-
gespült, mit HCl neutralisiert und mit Wasser aufgefüllt. Bei
einer Ausgangslösung von nur 10 ml brachte die Destillation
keine wesentliche Vorteile. Es wurde daher versucht, eine
empfindlichere Methode zu finden.

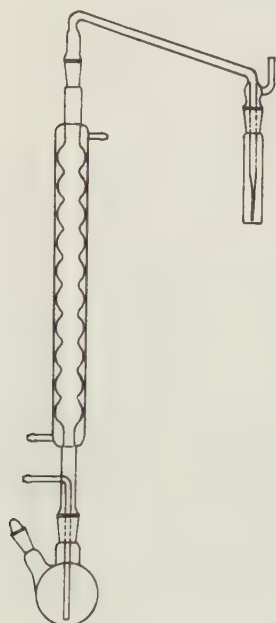


Abb. 4 Verkleinerte Reith - Willems Apparatur mit
100 ml Kolben und 10 ml fassender Vorlage.

Es wurden die kolorimetrischen Methoden von I. R i c h t e r
und L. K n y (63) und P. D u p a i g n e (64) auf ihre
Brauchbarkeit untersucht.

Die Methode nach Richter und Kny wurde geringfügig abgewan-
delt. Die Herausdestillation wurde auf die gleiche Art und
unter den gleichen Bedingungen, wie bei der enzymatischen
Methode, durchgeführt. Die Vorlage wurde neutralisiert und

auf 5 oder 10 ml aufgefüllt. Eine 0,5 bis 4,0 γ SO_2 entsprechende Menge wurde mit Sörensen Puffer von pH 7,2 vermischt. Nach dem Zufügen von 5,0 ml einer 0,001%igen Malachitgrünlösung wurde mit Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Die Extinktion dieser Lösung wurde zwischen 15 und 30 Minuten nach dem Umschütteln im Zeiss Spektralphotometer in 2 cm Küvetten bei 610 nm gegen Luft gemessen. Mit Natriummetabisulfitlösungen von bekanntem Gehalt wurde eine Eichkurve aufgestellt. Die unterste Nachweisgrenze waren 0,4 ppm, wenn 10 ml Untersuchungsflüssigkeit zur Verfügung standen.

Die 2. kolorimetrische Methode nach Dupaigne (64) wurde in der Modifizierung nach Ph. W. West und G.C. Gaeke (65) zur Bestimmung von SO_2 in der Luft, nun für die Bestimmung von SO_2 in Flüssigkeiten ausprobiert.

Das SO_2 wurde wieder in der gleichen Apparatur herausdestilliert. Als Vorlage dienten 5,0 ml einer 0,1 M Lösung von Natriumtetrachloromercurat. Dieses bildet mit SO_2 das nicht flüchtige Disulfitomercurat = $\text{Na}_2 [\text{Hg}(\text{SO}_3)_2]$. Die Vorlage wurde mit 1,0 ml 0,04%iger p-Rosanilinhydrochloridlösung und 1,0 ml 0,2%iger Formaldehydlösung versetzt und mit 0,1 M Natriumtetrachloromercuratlösung auf 10,0 ml aufgefüllt. Nach 20 bis 30 Minuten wurde die Lichtabsorption bei 560 nm gegen eine Blindlösung der Reagenzien in 1 cm Küvetten im Zeiss Spektralphotometer gemessen. Mit Lösungen von bekanntem Sulfitgehalt wurde eine Eichkurve aufgestellt. Bis zu 20,0 γ an SO_2 folgt die Absorption dem Lambert - Beerschen Gesetz (Abb. 5).

West und Gaeke konnten in 10 ml Meßlösung 0,5 - 25 γ SO_2 bestimmen. Sie berichteten, daß Nitrate und hohe Konzentrationen von Sulfit kleine Mengen des Quecksilbersalzes reduzieren können. NO_2 als Störfaktor war bei den zu untersuchenden Proben nicht zu erwarten. Störend war aber, daß bei zu hohen SO_2 -Konzentrationen, die bei 2,0 mg SO_2 für 10,0 ml Vorlage lagen, Quecksilber I-chlorid ausfiel. Proben, die mehr als 2,0 mg SO_2 in der Vorlage erwarten ließen, mußten

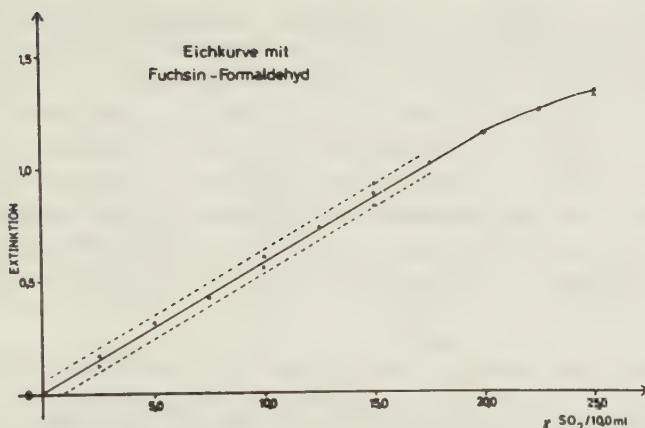


Abb. 5 Eichkurve von Sulfit, berechnet als SO_2 mit p-Rosanilin (Fuchsin) und Formaldehyd.
Gestrichelte Linien: Fehlerbreite der Mittelwerte.

vor der Destillation verdünnt werden, oder es durften nur soviel ml destilliert werden, daß die angegebene Sulfitkonzentration nicht überschritten wurde. Um die spektralphotometrische Methode mit der enzymatischen vergleichen zu können, wurde die Empfindlichkeit wieder statistisch aus zwei Mittelwerten errechnet. Von 11 Mittelwerten der Eichkurve wurde eine Standardabweichung von

$$s = 0,42 \text{ g SO}_2 \text{ abs.}$$

und ein Streubereich bei einer angenommenen statistischen Sicherheit von 95% mit

$$\Delta \bar{x} = 0,91 \text{ g SO}_2 \text{ abs.}$$

berechnet. In 10,0 ml Meßlösung lassen sich daher nur noch 1 g SO_2 mit Sicherheit erfassen. In einer Reihe von Beleganalysen, die verdünnt wurden, um bei gleicher Ausgangskonzentration einen Vergleich mit der enzymatischen Methode zu haben, wurde ebenfalls die Standardabweichung für Proben verschiedenen Gehaltes bestimmt.

Tab. 3

Probe	Vorgelegte SO ₂ -Menge in ppm	Gefundene SO ₂ -Menge in ppm
1	5,0	5,8
2	25,0	26,7
3	45,0	46,25
4	50,0	51,7
5	65,0	63,75
6	75,0	76,75
7	90,0	90,0
8	100,0	102,8

Die Standardabweichung betrug bei 8 Proben mit 23 Einzelbestimmungen $s = 1,84$ ppm SO₂ abs. und der Streubereich $\Delta x = 3,8$ ppm SO₂ abs. Das Verfahren ist daher ebenfalls reproduzierbar. Der Fehler ist außerdem erheblich kleiner, als bei der enzymatischen Methode. Die Messung kann auch bei höheren SO₂-Konzentrationen ausgeführt werden.

Es wurde untersucht, ob sich die enzymatische Methode auch zur Bestimmung von SO₂ in Lebensmitteln verwenden läßt.

In festen Lebensmitteln wie Trockenobst und Stärke wurde das SO₂ nach der Destillation bestimmt. Aus Essig wurde das SO₂ auch herausdestilliert, da die darin erhaltenen Mengen für eine Direktbestimmung zu gering waren.

Bei der Bestimmung von senföhlhaltigen Produkten tritt immer ein Fehler auf, der auf einen scheinbaren SO₂-Gehalt des Senföls zurückzuführen ist. Nach W. D i e m a i r und H. B a u e r (66) beruht dieser Fehler auf dem oxidativen Abbau des, bei der Destillation in die Vorlage gelangenden Allylsenföls, wenn die Vorlage ein Oxidationsmittel enthält, wie es bei der komplexometrischen und gravimetrischen Bestimmung des SO₂ der Fall ist. Sie hatten bei der Destillation aus wässriger Lösung 3,2 bis 55,6 g SO₂ pro Liter Senföhl gefunden.

0,1 ml synthetisches Allylsenöl, die nach der komplexometrischen Bestimmungsmethode von Reith - Willems 0,32 - 5,56 mg SO_2 entsprachen, wurden in der gleichen Weise, wie die anderen enzymatischen Analysen destilliert. Es konnte mit der neutralisierten Vorlage, die deutlich nach Senföl roch, keine Hemmung der LDH beobachtet werden. Der Fehler bei der SO_2 -Bestimmung in senföhlhaltigen Produkten könnte mit der Bestimmung des SO_2 nach der enzymatischen Methode vermieden werden. Eine praktische Anwendung der enzymatischen Methode wird aber wegen der hohen Fehlerbreite nicht durchführbar sein.

Im Wein wurde versucht, das SO_2 ohne vorausgehende Destillation zu bestimmen. Mit SO_2 -freiem Apfelwein und Brennwein, sowie mit 15%igem Alkohol wurde der Hemmungstest durchgeführt. Weder Apfel-, noch Brennwein, noch reiner Alkohol, zeigten irgendeine Hemmwirkung. Die direkte Bestimmung von SO_2 im Wein lieferte aber immer zu geringe Werte. Es wurde zunächst angenommen, daß in dieser Verdünnung, wie der Wein im Testansatz vorliegt, die SO_2 -Aldehydverbindungen vollständig dissoziiert sind, und daß man die gemessenen SO_2 -Mengen als gesamtschweflige Säure betrachten könnte. Der Testversuch mit einer Lösung von 50 ppm SO_2 und einem Überschuß an Acetaldehyd, als zur Bindung des SO_2 erforderlich war, zeigte, daß kein SO_2 mehr nachzuweisen war. Der Hemmungstest nach vorausgegangener Destillation zeigte ebenfalls kein SO_2 an. Der Acetaldehyd war also bei der Destillation mit in die Vorlage gelangt und hatte das SO_2 vollständig gebunden. Acetaldehyd allein zeigte keine Hemmwirkung.

Tab. 4

Probe	Gesamt SO ₂ -Gehalt in ppm kompleximetrisch	Gesamt SO ₂ -Gehalt in ppm enzymatisch
Trockenäpfel	800,0	816,0
Essig	5,0	4,75
Stärke	6,0	7,20

Probe	Gesamt SO ₂ -Gehalt in ppm gravimetrisch	Gesamt SO ₂ -Gehalt in ppm enzymatisch
Wein unverdünnt	155,0	100,0
Wein unverdünnt	146,8	88,0
derselbe Wein 1:2 verdünnt		95,0
derselbe Wein mit Zusatz v. 100 ppm SO ₂ 1:2 verdünnt		222,0
Wein unverdünnt	310,0	
derselbe Wein 1:5 verdünnt		200,0
derselbe Wein mit Zusatz v. 500 ppm SO ₂ 1:10 verdünnt		720,0

Für die SO₂-Bestimmung in Wein ist der direkte enzymatische Nachweis und der, nach Isolierung des SO₂ durch Destillation, nicht geeignet, da die gebundene schweflige Säure zum Teil, aber nicht vollständig durch die Verdünnung im Testansatz dissoziiert ist. Eine Destillation schließt den Fehler nicht aus, da der Aldehyd ebenfalls in die Vorlage gelangt. Für die SO₂-Bestimmung in sonstigen Lebensmitteln wird der Hemmungstest wegen seiner Kostspieligkeit und der relativ hohen Fehlerbreite nicht zu Anwendung kommen. Er kann aber gute Dienste leisten, wenn nur geringe Mengen Untersuchungsmaterial zur Verfügung stehen.

2. Untersuchung von, mit Sulfit
behandeltem, Speichel, Ma-
gensaft, Duodenalsaft und
Leberhomogenisat.

Speichel:

Von 6 Versuchspersonen standen jeweils etwa 10 ml Speichel zur Verfügung. Der Speichel wurde auf seinen pH-Wert geprüft und auf 37°C im Thermostaten erwärmt. Dann wurde er mit Natriummetabisulfitlösung versetzt und 10 Minuten in einem verschlossenen Gefäß bei 37°C belassen. Anschließend wurde versucht, direkt mit dem Speichel den Hemmungstest auszuführen. Speichel allein ohne Sulfit vermochte die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion nicht zu beeinflussen. Die erhaltenen Werte lagen aber innerhalb der Fehlergrenze. Die Proben wurden daher destilliert und das SO₂ mit Fuchsin-Aldehyd bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf 100 ml Speichel umgerechnet.

Tab. 5

Versuchs- person	pH- Wert	Zugesetztes SO ₂ in mg/ 100 ml	Gefundenes SO ₂ in mg/ 100 ml	Oxidiertes SO ₂ in % d. zußes. Menge
1	6,2	7,04	6,16	12,4
2	7,1	8,48	7,35	13,4
3	6,7	8,34	6,78	18,6
4	6,7	13,18	10,88	17,4
5	7,0	7,56	6,49	14,2
6	7,2	10,00	7,24	27,6

Fehler: ± 0,38 mg/100 ml

100 ml Speichel vermochten 0,88 - 2,76 mg SO₂ zu oxidieren. Die Oxidation des Sulfits war vom pH-Wert unabhängig. Sie war aber abhängig von der Speichelart der Untersuchungspersonen.

Magensaft:

Magensäfte von Patienten aus der Universitätsklinik standen für die Untersuchungen zur Verfügung. Die Magensäfte wurden mittels einer Magensonde den Patienten entnommen, die vorher zur Anregung der Magensekretion einen Coffeintrunk erhalten hatten. Das so gewonnene Produkt enthielt kein reines Magensekret, sondern ein Gemisch aus Coffeintrunk, Speichel und Magensaft. Diese Magensäfte wurden je nach Menge mit Natriummetabisulfitlösung versetzt. Es wurden durchschnittlich 8,0 ml Magensaft mit 2,0 ml Sulfitlösung versetzt, so daß das Verhältnis 10 : 2 betrug. Die mit Sulfit behandelten Magensäfte wurden in, mit Schliffstopfen verschlossenen, Reagenzgläsern im Thermostaten bei 37°C verschieden lang inkubiert. Anschließend wurde der SO_2 -Gehalt mit der Enzymhemmung bestimmt. Die meisten Magensäfte zeigten keine Eigenhemmung, und die SO_2 -Bestimmung konnte direkt ausgeführt werden. Wurde eine Eigenhemmung festgestellt, so wurde diese von der eigentlichen Sulfitthemmung abgezogen. Parallelbestimmungen, bei denen das SO_2 herausdestilliert wurde, ergaben die gleichen Ergebnisse.

Die sulfithaltigen Magensäfte wurden gegen eine wässrige Natriummetabisulfitlösung vom pH 5 gemessen, die eine Inkubationszeit von gleicher Dauer hinter sich hatte, um eine mögliche Autoxidation des Sulfits auszuschließen. Ein Zusatz von Komplexon zu den Magensäften zur Ausschaltung der Autoxidation wurde nicht angewandt, weil dies nicht den physiologischen Bedingungen entsprach. Die Autoxidation der wässrigen Sulfitlösung während der Inkubationszeit war sehr gering.

Erfolgte eine Oxidation des Sulfits in den Magensäften, so war sie spontan. Das Ausmaß der Oxidation war nach 10 - 15 minütiger Inkubationszeit das gleiche, wie nach 30 Minuten, 1 Stunde, 1 1/2 Stunden und 2 Stunden.

Flüssigkeiten sollen bei gefülltem Magen gleich in den Darm gelangen können. Die Verweildauer für Speisen richtet sich nach ihrer Zusammensetzung. Während Milchnahrung bereits nach

1 - 2 Stunden restlos in den Darm übergetreten ist, bleibt die gemischte Kost bis zu 4 Stunden im Magen nachweisbar. Bei Speisen erfolgt auch eine völlige Durchsäuerung mit Magensaft erst nach 1/2 - 1 Stunde (42).

Für den Vergleich der Oxidation von Sulfit durch verschiedene Magensäfte wurde daher eine allgemeine Inkubationszeit von einer Stunde eingehalten.

Tab. 6

Probe	pH	Zugesetztes SO ₂ in mg/100 ml Magensaft	Gefundenes SO ₂ in mg/100 ml Magensaft	Oxidiertes SO ₂ in mg/100 ml Magensaft	Oxidiertes SO ₂ in % d. zuges. Menge
1	2	4,17	2,10	2,17	52
2	2	6,25	5,50	0,75	12
3	2	6,25	4,13	2,12	39
4	2	8,33	8,33	0	0
5	2	16,70	16,00	0,7	4,2
6	3	12,50	12,50	0	0
7	3	12,50	6,25	6,25	50
8	5	5,50	4,78	0,72	13,1
9	6	12,50	11,62	0,88	7,04
10	6	12,50	10,45	2,05	16,4
11	7	5,56	2,50	3,06	55
12	7	8,06	4,03	4,03	50
13	7	12,50	6,25	6,25	50
14	7	12,50	7,63	4,87	39
15	7	16,70	9,42	7,28	43,6

Fehler: $\pm 1,1$ mg SO₂/100 ml

Von 10 sauren Magensäften pH 2 - 6 zeigten 3 eine Oxidation von durchschnittlich 2,0 mg SO₂/100 ml Magensaft, einer oxidierte sogar 6,25 mg SO₂/100 ml Magensaft. Die oxidierten SO₂-Mengen unterhalb 1,1 mg/100 ml fallen unter die Fehlergrenze.

Von den alkalischen Magensäften, die alle mit einem physiologischen pH-Wert von 7 aus der Universitätsklinik bezogen wurden, zeigten alle eine durchschnittliche Sulfitoxidation von 50%, unabhängig von der zugesetzten Sulfitmenge. Da unbekannt war, ob die Magenausheberungen immer auf nüchternen Magen erfolgten oder ob, außer dem Coffeintrunk eine medikamentöse Behandlung vorausgegangen war, wird die Oxidation des Sulfits in den sauren Magensäften als Zufall angesehen. Die Oxidation in den alkalischen Magensäften dagegen scheint eine Autoxidation des Sulfits zu sein, die von den Magensäften katalysiert werden könnte. Die Autoxidation von Sulfitlösungen ist pH-abhängig. Sie soll unabhängig vom pH-Wert zwischen 8,8 und 8,2 sein, aber zwischen pH 5,9 und 3,2 abnehmen (3).

Duodenalsaft:

Duodenalsaft durch Duodenalsondierung aus dem Duodenum gewonnen, besteht aus einer alkalischen Flüssigkeit, die auch als A-Galle bezeichnet wird, da sie zum großen Teil aus Gallensaft besteht. Nach dem Eingeben von Öl sezerniert die Gallenblase dickflüssige Blasengalle, die man mit B-Galle bezeichnet.

A- und B-Gallen, die einen pH-Wert von 7,0 bis 8,0 besaßen, wurden getrennt mit Natriummetabisulfitlösungen versetzt und auf 37°C im Thermostaten erwärmt. Die Oxidation des Sulfits trat wie bei den Magensäften spontan ein und steigerte sich nicht mit zunehmender Inkubationszeit. Bei Konzentrationen ab 100 ppm an Sulfit konnte eine Farbaufhellung der Gallensäfte beobachtet werden. Eine direkte enzymatische Bestimmung war hier wegen der stark gefärbten Lösung nicht mehr möglich. Es wurde vor jeder SO_2 -Bestimmung eine Destillation ausgeführt.

Ergebnisse mit A - Gallen: Inkubationszeit 1 h

Tab. 7

Probe	Zugesetztes SO ₂ in mg ² / 100 ml A-Galle	Gefundenes SO ₂ in mg ² / 100 ml A-Galle	Oxidiertes SO ₂ in mg ² / 100 ml A-Galle	Oxidiertes SO ₂ in % d. zuges. SO ₂ -Menge
1	6,25	0	6,25	100
2	6,25	0	6,25	100
3	6,25	1,95	4,30	68,8
4	6,25	2,65	3,60	57,6
5	6,75	0	6,75	100
6	10,70	7,14	3,56	33,3
7	12,50	5,38	7,12	57
8	12,50	4,38	8,12	65
9	12,50	6,25	6,25	50
10	12,50	8,73	3,77	30,2
11	15,62	9,85	5,77	35

Fehler: $\pm 1,1$ mg SO₂/100 ml
A-Galle

Von 100 ml A-Galle wurden durchschnittlich 5,60 mg SO₂ oxidiert.

Ergebnisse mit B - Gallen: Inkubationszeit 1 h

Tab. 8

Probe	Zugesetztes SO ₂ in mg ² / 100 ml B-Galle	Gefundenes SO ₂ in mg ² / 100 ml B-Galle	Oxidiertes SO ₂ in mg ² / 100 ml B-Galle	Oxidiertes SO ₂ in % d. zuges. SO ₂ -Menge
1	9,7	3,18	6,52	70,8
2	12,5	4,00	8,50	68,0
3	12,5	3,13	9,37	75,0
4	12,5	3,54	8,96	71,7
5	12,5	8,60	3,90	31,2

Fehler: $\pm 1,1$ mg SO₂/100 ml

Von 100 ml B-Gallen konnten durchschnittlich 7,45 mg SO_2 oxidiert werden. Die oxidierten SO_2 -Mengen betrugen bis auf eine Ausnahme rund 70% der zugesetzten Mengen.

Nachdem die Untersuchungen am Duodenalsaft gezeigt haben, daß von 100 ml Duodenalsaft durchschnittlich 5 - 7 mg SO_2 oxidiert werden können, wurde untersucht, welcher Bestandteil des Duodenalsaftes die Oxidation des Sulfits auslösen könnte. Es war naheliegend, an die Gallenfarbstoffe zu denken. Nach Zusatz von Sulfid war eine Aufhellung der Gallenfarbstoffe zu beobachten gewesen. Eine Bleichung von Farbstoffen durch Sulfid ist nach den bisherigen Anschauungen nicht mit einer Reduktion des Farbstoffes und gleichzeitiger Oxidation des Sulfits verbunden, sondern man nimmt an, daß der Farbstoff mit dem Sulfid eine Additionsverbindung eingeht. Der genaue Reaktionsverlauf des Sulfits mit den einzelnen Farbstoffen ist unbekannt. Man nimmt aber an, daß eine ähnliche Additionsverbindung wie bei der Fuchsin-schwefligen Säure entsteht (3).

Von den Gallenfarbstoffen wurden Biliverdin und Bilirubin untersucht. Biliverdin und Bilirubin sind bekanntlich Abbauprodukte des Blutfarbstoffes, bei denen der Porphyrinring aufgespalten ist, das Eisen und die Proteinkomponente abgetrennt sind und die gestreckte, vierkernige Pyrrolfarbstoffe darstellen. Bilirubin wird dabei durch Reduktion des Biliverdins erhalten.

Von Biliverdin und Bilirubin wurden wässrige Lösungen hergestellt. Biliverdin wurde, da es schlecht wasserlöslich ist, in wenig verdünnter Natronlauge gelöst und mit Wasser aufgefüllt. Es wurden Lösungen von 10,0, 20,0, 25,0 und 50,0 mg Biliverdin und Bilirubin gesondert in 100,0 ml Wasser hergestellt und auf einen pH-Wert von 7 - 8 gebracht. Den Lösungen von Biliverdin und Bilirubin wurden 5 bis 25 mg ansteigend SO_2 zugesetzt. Nach der Destillation wurden die SO_2 -Mengen mit dem Hemmungstest bestimmt. In keinem Fall war eine Oxidation des Sulfits zu beobachten. Auch Erhöhung der Inkubationszeit auf 3 Stunden veränderte das Ergebnis nicht. Die Oxidation des Sulfits im Darm kann also von den Gallenfarbstoffen allein nicht ausgelöst werden.

Leber:

Frischgeschlachtete Schweineleber wurde mit der 1,5 fachen Menge Wasser im Starmix homogenisiert und 30 Minuten unter Rühren extrahiert. Der Leberbrei wurde darauf durch Mull gestrichen. Der erhaltene Lebersaft wurde mit Lösungen von Natriummetabisulfit versetzt und im Thermostaten bei 37°C in einem verschlossenen Gefäß inkubiert. Nach Verweilzeiten von 1/2 bis 1 1/2 Stunden wurde die Mischung destilliert und das SO₂ enzymatisch und mit Malachitgrünlösung bestimmt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Die SO₂-Mengen wurden auf 100,0 g Leber umgerechnet.

Tab. 9

Inkubationszeit in h	Zugesetztes SO ₂ in mg ² / 100 g Leber	Gefundenes SO ₂ in mg ² / 100 g Leber	Oxidiertes SO ₂ in mg ² / 100 g Leber	Oxidiertes SO ₂ in % d. 2. zuges. SO ₂ -Menge
1/2	16,8	10,5	6,3	37,5
1/2	16,8	10,5 ⁰	6,3	37,5
1 1/2	12,6	6,3	6,3	50
1 1/2	12,6	6,8 ⁰	5,8	46
1	25,2	14,2	11,0	43,7
1	25,2	15,5 ⁰	9,7	38,5

x⁰ = Werte der Malachitgrünbestimmung

Die Sulfitoxidation durch Schweineleber mußte wie bei der Magen-Darm-Oxidation spontan erfolgen, da sie sich mit der Inkubationszeit nicht wesentlich veränderte. Bei dem einheitlichen Untersuchungsmaterial der Schweineleber konnte ein, der zugesetzten Sulfitmenge ungefähr proportionaler Anstieg an oxidiertem Sulfit beobachtet werden. Das schließt eine direkte Beteiligung der untersuchten Flüssigkeiten an der Sulfitoxidation aus. Die Oxidation könnte aber von den Flüssigkeiten katalysiert werden. Daß im alkalischen Milieu nur eine Oxi-

tion von 50% der vorhandenen Sulfitmenge erfolgt, könnte vielleicht daran liegen, daß nur 50% der Oxidation zugänglich sind und daß die anderen 50% vom Magen-, Darm- oder Lebersaft gebunden werden. Eine Abhängigkeit der Oxidation des Sulfits vom Sauerstoffgehalt bzw. der Luftmenge im Inkubationsgefäß ist ebenfalls nicht gegeben, da die zur Oxidation verfügbare Luftmenge bei jeder Sulfitkonzentration gleich war. Eine Oxidation während der Destillation ist nicht anzunehmen, da aus der Apparatur der Sauerstoff durch Stickstoff verdrängt worden war. Eine Oxidation durch eventuell freiwerdenden Sauerstoff aus dem Untersuchungsmaterial müßte bei gleichen Ausgangsmengen immer die gleichen Mengen an oxidiertem Sulfit geben. Die Oxidation dürfte nicht bei Erhöhung der Sulfitmengen zunehmen. Zur Klärung dieser Frage wurde der Sauerstoffverbrauch der Lebersuspension mit und ohne Sulfit im Warburg-Gerät gemessen. Zur Untersuchung stand diesmal Rinderleber zur Verfügung. Die frischgeschlachtete Rinderleber wurde mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung versetzt und homogenisiert. Darauf wurde sie durch Mull gestrichen. Die Lebersuspension wurde mit Natriummetabisulfitlösung versetzt, 1 Stunde bei 37°C im verschlossenen Gefäß inkubiert, destilliert und die noch vorhandenen Sulfitmengen enzymatisch bestimmt.

Es wurden folgende Werte erhalten:

Die zugesetzten Sulfitmengen wurden auf 100,0 g Leber umgerechnet.

Tab. 10

Inkubationszeit	Zugesetztes SO ₂ in mg ² / 100 g Leber	Gefundenes SO ₂ in mg ² / 100 g Leber	Oxidiertes SO ₂ in mg ² / 100 g Leber	Oxidiertes SO ₂ in % d. zuges. SO ₂ -Menge
1 h	27,2	10,9	16,3	60
1 h	13,6	5,03	8,57	63

Zur Messung des Sauerstoffverbrauches der Lebersuspension wurden 1,0 ml Lebersuspension in den Hauptraum des Warburg-Gefäßes gegeben. Der zentrale Teil enthielt 0,2 ml 20%ige KOH zur Absorption des entstehenden CO_2 . In den Seitendarm des Warburgkölbcchens wurden 0,2 ml Natriummetabisulfitlösung eingefüllt, die $11,2 \times 10^{-6}$ Mol SO_2 entsprachen. Das Volumen wurde mit M/15 Phosphatpuffer pH 7,6 auf 2,0 ml ergänzt. Als Sauerstoffquelle diente Luft. Nach Einstellung des Gleichgewichtes wurde die Sulfitlösung in den Hauptraum des Warburgkölbcchens gekippt und der Verbrauch an Sauerstoff in 15 minütigem Abstand bis zu zwei Stunden am Manometer abgelesen. Der Sauerstoffverbrauch war bei den Leberproben ohne Sulfit der gleiche, wie bei den Proben mit Sulfit. Reine Sulfitlösungen in Sörensenpuffer pH 7,6 zeigten ebenfalls keinen Sauerstoffverbrauch. Falls eine Sulfitoxidation in der Lebersuspension bei 37°C eintritt, so kann sie nicht sauerstoffabhängig sein.

Bei allen Proben wurde das Filtrat des Destillationsrückstandes qualitativ mit Bariumchlorid auf das gebildete Sulfat geprüft. Vor der Denaturierung der Eiweißstoffe war eine Prüfung mit Bariumchlorid nicht möglich.

3. U n t e r s u c h u n g e n v o n B l u t , n a c h Z u s a t z v o n S u l f i t .

Menschen-, Rinder- und Schweineblut wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Sulfid zu oxidieren. Die dabei nach der Destillation erhaltenen Rest-SO₂-Mengen waren so gering, daß angenommen werden konnte, daß der Ort der Sulfidoxidation im Organismus das Blut sei. Für 100 ml Blut wurden nach einer Inkubationszeit bei 37°C und anschließender Destillation mit dem Hemmungstest folgende Ergebnisse erhalten:

Tab. 11

Blutart	Zugesetztes SO ₂ in mg ² / 100 ml Blut	Gefundenes SO ₂ in mg ² / 100 ml Blut	Oxidiertes SO ₂ in mg ² / 100 ml Blut	Oxidiertes SO ₂ in % d. zuges. SO ₂ -Menge
Mensch	34,1	6,83	17,30	50,70
"	16,7	0	16,70	100,00
"	14,3	0	14,30	100,00
"	14,3	2,43	11,87	83,25
"	33,4	11,35	22,05	66,10
"	40,0	13,60	26,40	66,00
Schwein	50,0	6,60	43,40	86,80
"	43,8	5,00	38,80	88,50
"	43,8	6,25	37,55	85,70
"	50,0	8,80	41,20	82,50
"	50,0	7,00	43,00	86,00
"	43,8	1,38	42,42	96,60
"	43,8	2,50	41,30	94,30
Rind	33,0	1,15	31,85	96,60
"	60,0	2,20	57,80	96,40

Fehler: † 1,1 mg SO₂/100 ml

Bei dem Menschenblut handelte es sich um Untersuchungsproben aus den Universitätskliniken, die von verschiedenen Personen stammten, und einen Tag alt waren.

Die Schweineblutproben wurden an verschiedenen Tagen aus jeweils dem gleichen Schweineblut untersucht, das in kleinen Portionen eingefroren war und für die Bestimmung aufgetaut wurde.

Das Rinderblut stammte von einem frischgeschlachteten Tier aus dem Schlachthof und war am gleichen Tag noch untersucht worden. Da das Blut wesentlich mehr SO_2 zu oxidieren vermochte, als Magen, Darm oder Leber, wurde dem Blut mehr Aufmerksamkeit gewidmet, um die Ursache der Oxidation des Sulfits im Blut zu klären.

Es wurde zunächst das Blutserum für sich allein mit Sulfid versetzt und der Rest-Gehalt an SO_2 bestimmt. Es zeigte sich, daß Blutserum allein SO_2 nicht zu oxidieren vermochte. Für die Sulfidoxidation mußten also die Erythrocyten verantwortlich sein. Es wurde festgestellt, daß die Oxidation von Sulfid im venösen Blut geringer war, als im arteriellen. Es war naheliegend anzunehmen, daß die Sulfidoxidation vom Sauerstoffgehalt des Blutes abhing.

Zum Beweis wurde durch Einleiten von Stadtgas in Rinderblut Kohlenmonoxyd-Hämoglobin ($\text{Hb} - \text{CO}$) hergestellt. Die völlige Umwandlung des Oxy-Hämoglobins ($\text{Hb} - \text{O}_2$) zum $\text{Hb} - \text{CO}$ wurde spektralphotometrisch verfolgt. Nach dem Zusatz von Sulfid in Form der Natriummetabisulfidlösung und einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C wurde das Sulfid mit Fuchsin-Aldehyd nach vorausgegangener Destillation bestimmt. Es zeigte sich, daß $\text{Hb} - \text{Co}$ nicht imstande war, Sulfid zu oxidieren. Es wurde alles Sulfid wiedergefunden. Ein mehrstündiges Durchleiten von Stickstoff zur Verteilung des Sauerstoffes aus dem $\text{Hb} - \text{O}_2$ brachte den Nachweis, daß auch Hämoglobin nicht in der Lage war, Sulfid zu oxidieren. Die Oxidation des Sulfits erfolgt also von dem, ans $\text{Hb} - \text{O}_2$ gebundenen Sauerstoff. Versetzt man aber Blut oder eine Erythrocytensuspension mit 50-100 mg SO_2 /100 ml Blut, so tritt nicht die blaurote Farbe des venösen Blutes auf, sondern die hellrote Farbe des arteriellen

Blutes bleibt erhalten. Bewahrt man das mit Sulfit behandelte Blut im Kühlschrank neben dem unbehandelten Blut mehrere Tage auf, so zeigt sich, daß das unbehandelte Blut seinen Sauerstoff bald abgibt und venös wird, während das mit Sulfit behandelte Blut seine hellrote Farbe bewahrt. Das Sulfit vermag also in dieser Konzentration nicht den Sauerstoff, der an das Hämoglobin gebunden ist, zu seiner Oxidation zu verwenden. Das Sulfit stabilisiert im Gegenteil das $\text{Hb} - \text{O}_2$. Die ermittelte Sulfitoxidation durch Blut muß daher während des Destillationsvorganges erfolgen, bei dem durch die Hitzeeinwirkung und der Ansäuerung das $\text{Hb} - \text{O}_2$ - Molekül denaturiert wird und der Sauerstoff aus seiner Bindung an das Hämeisen freigesetzt wird.

Zur Erhärtung der Annahme, daß die Oxidation des Sulfits vom Sauerstoffgehalt des Blutes abhängt, wurden in gleichlaufenden Proben der Sauerstoffgehalt des Blutes, die oxidierte Sulfitmenge und der Hb - Gehalt des Blutes bestimmt.

Der Sauerstoffgehalt des Blutes wurde in der Warburg-Apparatur nach der Methode von Barcroft und Haldane (67) bestimmt. Dazu wurde in den Hauptraum des Warburggefäßes 1,5 ml 0,4%ige Ammoniaklösung und 1,0 ml Blut gebracht. Der Ammoniak hämolysierte das Blut. In den Seitenarm wurden 0,3 ml gesättigte Kaliumferricyanidlösung eingefüllt. Zur Absorption des CO_2 wurden in das Zentralgefäß des Warburgkölbchens und in den Schliffhals des Manometers mit 0,2 ml 20%iger KOH getränkte Schwämmchen gebracht. Nach Äquilibration wurde das Kaliumferricyanid in das hämolysierte Blut gekippt. Kaliumferricyanid setzt nach folgender Gleichung (42) den Blutsauerstoff quantitativ in Freiheit:



Ferricyanid oxidiert unter gleichzeitiger Reduktion zum Ferrocyanid, das Hämoglobin zum Methämoglobin. Der dabei freiwerdende Sauerstoff wird manometrisch gemessen. Die so erhaltenen Werte für Sauerstoff geben die Sauerstoffkapazität, d.h. die maximale Sauerstoffmenge, die das Hämoglobin aufnehmen kann, an. Der O_2 -Gehalt wird erhalten, wenn man vor der Kalium-

ferricyanidzugabe die Aufsättigungsvolumenprocente bestimmt. Diese bedeuten die Sauerstoffmenge, die das Hämoglobin während der Äquilibrierung aus der Luft aufnimmt, um sich voll mit Sauerstoff zu sättigen. Der Sauerstoffgehalt errechnet sich dann aus der Volumenprozent - O_2 - Kapazität abzüglich den Aufsättigungsvolumenprozenten.

Wurden sulfithaltige Blutproben in der Warburg-Apparatur analysiert, so wurden erheblich geringere Sauerstoffmengen gefunden. Eine quantitative Aussage über die Sauerstoffdifferenz konnte aber nicht gemacht werden, da das im Überschuß zugesetzte Kaliumferricyanid ebenfalls SO_2 oxidierte. Eine erhöhte Sauerstoffaufnahme bei den sulfithaltigen Blutproben vor der Kaliumferricyanidzugabe konnte nicht beobachtet werden. Eine aerobe Sulfitoxidation konnte daher nicht stattgefunden haben.

Der Hämoglobingehalt wurde nach der Cyanhämglobinmethode (68) bestimmt.

Eine genaue Menge Blut wurde mit Kaliumferricyanid oxidiert und mit Kaliumcyanid in Cyanhämglobin übergeführt. Cyanhämglobin wurde bei 546 nm im Photometer Eppendorf gemessen. Nach einer Eichkurve wurde der Hämoglobingehalt ermittelt (69).

Das Sulfit wurde nach der Destillation mit Fuchsin-Aldehyd (65) bestimmt.

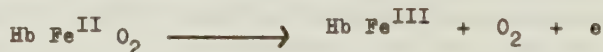
Sämtliche Sauerstoff- und gleichzeitigen Sulfitbestimmungen wurden mit Rinderblut durchgeführt. Die Tabelle 12 gibt die erhaltenen Ergebnisse wieder. Die in Spalte 6 unter I aufgeführten Werte geben die Sulfitmengen wieder, die theoretisch von dem, nach der Barcroft-Haldane-Methode ermittelten Blutsauerstoff oxidiert werden könnten. Es wurde zunächst angenommen, daß ein Teil des, bei der Destillation freiwerdenden Sauerstoffs zur Oxidation des Hämoglobins zum Methämoglobin benötigt wird. Die in Spalte 6 unter II aufgeführten Werte geben die theoretisch oxidierbaren Sulfitmengen wieder, nach Abzug des, für die Hämoglobinoxidation notwendigen Sauerstoffs.

Tab. 12

1	2	3	4	5	6	
Hb-Geh. g/ 100 ml	O ₂ -Geh. mg/ 100 ml	Zuges. SO ₂ in mg / 100 ml Blut	Gefund. SO ₂ in mg / 100 ml Blut	Oxid. SO ₂ in mg / 100 ml Blut	Theoretisch oxidierb. SO ₂ in mg/ 100 ml	
					I	II
10,68	19,15	40,00	0	40,0	76,5	56,2
10,35	14,60	33,00	0,6	32,40	58,6	38,6
10,35	14,60	50,00	5,04	44,96	58,6	38,6
10,35	14,60	35,70	1,34	34,36	58,6	38,6
12,83	20,60	55,50	2,44	53,06	82,4	58,0
12,83	20,60	55,50	2,11	53,39	82,4	58,0
11,97	20,00	172,50	93,00	79,50	80,0	57,2
11,97	20,00	86,25	15,00	71,25	80,0	57,2
4,68	6,60	55,50	31,00	24,50	26,4	17,4
4,68	6,60	60,00	35,00	25,00	26,4	17,4

Fehler: $\pm 0,38$ mg SO₂/100 ml

Die Annahme erwies sich, wie aus den Ergebnissen zu ersehen ist, als falsch. Es wurde weit mehr Sulfit oxidiert, als theoretisch nach den unter II angegebenen Werten möglich gewesen wäre. Für die Oxidation des Hämoglobins wurde kein Sauerstoff gebraucht. Nach der Gleichung



ist für die Hämoglobinoxidation kein Sauerstoff notwendig, falls ein Elektronenakzeptor vorhanden ist. Es könnte sein, daß der Sauerstoff als Elektronenakzeptor fungiert und ein $\cdot\text{O}_2$ -Radikal bildet, das wiederum das Sulfit oxidiert. Für die Sulfitoxidation würde dann wieder ein 2-Elektronenakzeptor notwendig sein.

Die oxidierten SO_2 -Mengen stimmten ungefähr mit den unter I angeführten theoretischen Werten überein. Die geringen Mengen Sulfit, die gefunden wurden, obwohl nach dem O_2 -Gehalt des Blutes das Sulfit hätte vollständig oxidiert werden müssen, beruhen auf der sehr empfindlichen Fuchsin-Aldehyd-Methode. Bevor der Sauerstoff durch Denaturierung des Hb-Moleküls vollständig in Freiheit gesetzt wurde, gelangten wahrscheinlich aus der sauren Lösung schon geringe Mengen Sulfit in die Vorlage.

Es kann angenommen werden, daß eine sauerstoffunabhängige Sulfitoxidation vor der Destillation nicht stattgefunden hat, da die oxidierten Sulfitmengen nicht über die theoretischen Werte hinausgingen. Die letzten, in der Tabelle angeführten Werte mit dem niedrigen Hb-Gehalt, gehören zu einer verdünnten Hämoglobinlösung. Diese Lösung wurde aus, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Erythrocyten gewonnen. Die Erythrocyten wurden mit Wasser hämolysiert. Die hämolysierte Lösung wurde von den Erythrocytenmembranen durch Zentrifugieren befreit und stellte die Hämoglobinlösung dar. Diese Hämoglobinlösung ergab dieselben Resultate wie das Ganzblut.

4. Untersuchung von Blutspektren.

Nachdem festgestellt worden war, daß eine Oxidation des Sulfits im Blut nur vom Sauerstoff abhängig war, der bei der Destillation von seiner Bindung an das Hämoglobin in Freiheit gesetzt wird, wurde versucht, zu klären, ob eine Sulfitoxidation auch unter normalen Bedingungen stattfinden kann.

Die O_2 -Bindungskurve des Blutes hat einen S-förmigen Verlauf. Die Affinität des O_2 ist abhängig von der Temperatur und nimmt bei steigender Temperatur ab. Sie ist auch abhängig vom Sauerstoffpartialdruck im Plasma und vom pH-Wert. Nimmt der Sauerstoffpartialdruck im Plasma ab, da die Gewebe O_2 verbrauchen, so wird O_2 vom Hb abgegeben. Bei Erniedrigung des pH-Wertes wird ebenfalls O_2 vom Hb ans Plasma abgegeben. Dabei stellt das Hb ein wichtiges Pufferungssystem im Blut dar. Jedes Auftreten von Säuren, in vivo meist Kohlensäure, setzt gebundenes Alkali aus $Hb-O_2$ und Hb frei zur Abbindung der Säure. Das $Hb-O_2$ vermag doppelt soviel Alkali zu binden als das Hb, da es eine stärkere Säure darstellt (Bohr-Effekt). Bei einem Übergang vom $Hb-O_2$ zum Hb wird daher viel Alkali zur Säurebindung frei (42).

Bei Zusatz von schwefliger Säure müßte eigentlich der O_2 schneller vom $Hb-O_2$ abgegeben werden. Bei Zusatz von Sulfit zu Blut in vitro konnte mit dem bloßen Auge aber keine O_2 -Abgabe, d.h. eine Farbänderung festgestellt werden, ja, es wurde sogar eine Farbstabilisierung beobachtet.

Diese Eigenschaft des Sulfits wurde früher allgemein bei Fleischerzeugnissen verwendet, um dem Fleisch möglichst lange seine schöne rote Farbe zu erhalten. Durch diese Maßnahme konnte frisches Fleisch vorgetäuscht werden, nachdem schon Zersetzungserscheinungen der Eiweißverbindungen eingetreten waren. Die genaue Funktion des Sulfits bei dieser Farberhaltung steht nicht sicher fest. Es wird allgemein angenommen, daß das Sulfit als Reduktionsmittel dient. M. R u b n e r (70) gab dazu folgende Erklärung. Fleisch, das an der Luft liegt, verliert seine rote Farbe durch Oxidation des Hämoglobins zum Methämoglobin, das nicht mehr in der Lage ist, Sauerstoff zu binden. Die Oxidation

zum Methämoglobin soll besonders leicht durch aktiven Sauerstoff erfolgen. Dieser aktive Sauerstoff bildet sich, wenn indifferenten Sauerstoff mit Wasserstoff im statu nascendi zusammentrifft. Das Fleisch soll nun weiterhin befähigt sein, nascierenden Wasserstoff zu bilden. Dieser soll an den, für Sauerstoff zugänglichen Stellen, aktiven Sauerstoff erzeugen. Der aktive Sauerstoff würde, wenn er nicht vom Sulfit abgefangen würde, das Hämoglobin zum Methämoglobin oxidieren. Ein Angriff des Sulfits auf den ans Hämoglobin gebundenen Sauerstoff wurde von Rubner gar nicht in Erwägung gezogen.

Eine Reduktion des Oxyhämoglobins mit Sulfit ist aber möglich. So wurde bei der spektralphotometrischen Bestimmung von Blutsauerstoff das Blut reduziert mit 2% seines Volumens einer gesättigten Natriumhydrogensulfitlösung (71). Die Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff ist wahrscheinlich erst durch größere Sulfitmengen aufzuheben.

Bei der Untersuchung der Blutspektren wurden einmal die Sulfitmengen ermittelt, die notwendig waren, um das Oxyhämoglobin zu reduzieren und zum anderen, ob das Sulfit in der Lage war, irgendwelche spektralen Veränderungen hervorzurufen.

Nach F. H o p p e - S e y l e r und H. T h i e r f e l d e r (72) können einwertige Anionen durch die Erythrocytenmembran diffundieren. Läge das Sulfit als HSO_3 -Ion vor, so könnte es in die Erythrocyten eindringen und eine Veränderung des Hämoglobins durch eine eventuelle Bindung an das Hämoglobin hervorrufen. Bei dem physiologischen pH-Wert des Blutes von pH 7,3 - 7,5 liegt nur < 1% des Sulfits als HSO_3 -Ion vor. Eine Beeinflussung des Hämoglobins durch Sulfit wäre also nur im geringen Maße möglich.

Im sichtbaren Bereich gibt es für folgende Hämoglobin-Derivate ganz bestimmte Maxima (73), (72).

Hämoglobin	1 Maximum	bei	555 nm
Sulphämoglobin	1 Maximum	bei	610 - 625 nm
Oxyhämoglobin	2 Maxima	bei	577 u. 541 nm
CO - Hämoglobin	2 Maxima	bei	570 u. 539 nm
Methämoglobin	2 Maxima	bei	630 u. 500 nm
Hämochromogen (aus alkal. Lösg.)	2 Maxima	bei	558 u. 529 nm

Nach W. S c h e l e r (74) ist die Lichtabsorption der Hämoproteide eine durch das Zentralion modifizierte Porphyrinabsorption. Die bei 273 nm liegende Absorptionsbande findet sich bei allen Derivaten des Hämoglobins. Sie fehlt aber bei den proteinfreien. Da sie pH-abhängig ist, wird sie von Scheler auf die chromophore Gruppe im Protein bezogen. Die allen Hämderivaten zukommende Bande um 350 nm soll durch Veränderungen am Porphyrin beeinflusst werden. Die Soretbande um 400 nm ist eine Eigenschaft des Porphyrinringes. Die Wechselwirkung Porphyrin - Fe^{+++} soll das Maximum der Soretbande gegen längere Wellenlängen verschieben. Die im sichtbaren Bereich befindlichen Absorptionen sind Porphyrinbanden, die durch Liganden und Bindungsarten am Zentralion beeinflusst werden. Nach W. S c h e l e r (75) gibt es drei Grundtypen der Porphyrinspektren zwischen 700 und 380 nm, den 5 bandigen, den 4 bandigen und den 3 bandigen Typ. Jeder setzt eine bestimmte Konfiguration voraus. Der 4 bandige Typ tritt auf, wenn der Stickstoff des Pyrrol- und Maleinimidkernes je ein Proton anlagert, also in den ionisierten Zustand übergeht, was im stark sauren Milieu eintritt. Der 5 bandige Typ liegt im schwach sauren Milieu vor, wenn Pyrrolring und Maleinimidring in nicht ionisierter Form vorliegen und wenn gleichzeitig die freien Stickstoffe der Pyrroleinkerne durch Protonen oder H-Bindungen betätigt werden. Der 3 bandige Typ tritt im alkalischen Milieu auf. Er ist gekennzeichnet durch das Fehlen von H-Bindungen an den Pyrroleinkernen. Die Stickstoffatome treten in unmittelbare Wechselbeziehung zum Eisen. Nach Scheler bildet das Methämoglobin und andere Hämderivate zwischen pH 4,5 - 8 eine Tetraaquostruktur aus. Das Eisen ist mit seinen

4 Nebenvalenzen nicht mehr direkt mit den Stickstoffatomen des Porphyrins und den anderen Liganden verbunden, sondern über vier Wassermoleküle. Die Wasserbindung an das Methämoglobin liefert einen 5 bandigen Typ.

Die Wirkung des Sulfit wurde in verdünnten Blutlösungen untersucht, da keine Spezialküvetten für eine Untersuchung im Blut direkt zur Verfügung standen. 0,1 ml Blut wurde mit steigenden Mengen einer Lösung von Natriummetabisulfit, die 0,5 g SO_2 in 100,0 ml M/15 Phosphatpuffer pH 7,4 enthielt, versetzt. Die Ansätze wurden mit Phosphatpuffer auf 10,0 ml aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Spektren in 1 cm Küvetten im automatisch schreibenden Spektralphotometer, Perkin-Ellmer-Modell, 137 UV aufgenommen. Als Blindwert diente der Phosphatpuffer. Wie in Abbildung 6 zu ersehen ist, wurde mit 4,0 mg SO_2 nur eine geringe Abnahme des Oxyhämoglobinspektrums erzielt. Bei 5,0 mg SO_2 war sie schon deutlicher zu erkennen. In Abb. 7 zeigt sich bei 10,0 mg SO_2 schon ein Übergang ins Hämoglobinspektrum an, das bei 15,0 mg SO_2 noch ausgeprägter war. In Abb. 8 wurde mit 30,0 mg SO_2 die völlige Umwandlung des Oxyhämoglobins in das Hämoglobin erreicht. Das UV-Spektrum in Abb. 9 zeigte bei 30,0 mg SO_2 eine Abnahme des Proteinmaximums bei 275 nm. Das zum Porphyrin gehörende Maximum bei 350 nm ist gänzlich verschwunden. Da dies nach W. S c h e l e r (74) durch Veränderung am Porphyrin beeinflusst werden kann, müssen durch das Sulfit irgendwelche Veränderungen eingetreten sein. Nach diesen Ergebnissen dürften erst 4,0 g SO_2 auf 100 ml Blut das Oxyhämoglobin zu einer Abgabe des Sauerstoffes bewegen. Daß die Wirkung des Sulfit sehr von der Pufferung abhängt, zeigte ein Versuch, bei dem das Blut nicht mit Puffer, sondern mit Wasser verdünnt wurde. Hier wurden 0,1 ml Blut schon von 10,0 mg SO_2 vollständig in Hämoglobin übergeführt. In allen Fällen konnten aber die spektralen Veränderungen durch Belüftung wieder aufgehoben werden. Die spektralen Veränderungen durch Sulfit waren daher nicht irreversibel.

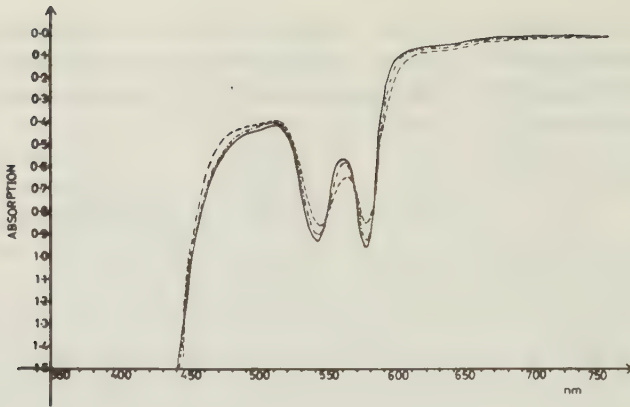


Abb. 6

Blutspektren

_____	0,1 ml Blut	ohne SO_2	in 10 ml Phosphatpuffer
-. - . - .	0,1 ml Blut mit 4 mg SO_2		in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,4
- - - -	0,1 ml Blut mit 5 mg SO_2		in 10 ml Phosphatpuffer

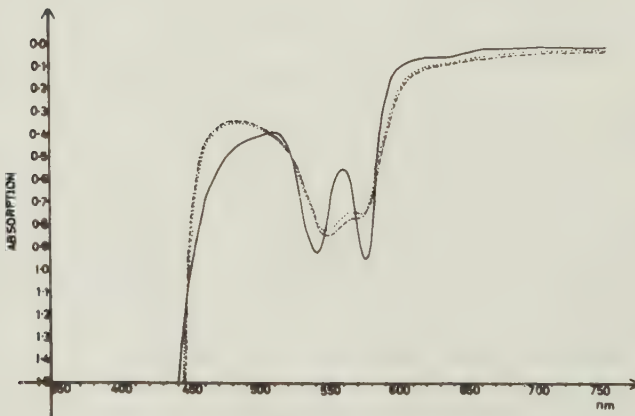


Abb. 7

Blutspektren

—	0,1 ml Blut ohne	SO ₂ in 10 ml Puffer pH 7,4
• • • • •	0,1 ml Blut mit 10 mg	SO ₂ in 10 ml Puffer pH 7,4
— • — • — • — • —	0,1 ml Blut mit 15 mg	SO ₂ in 10 ml Puffer pH 7,4

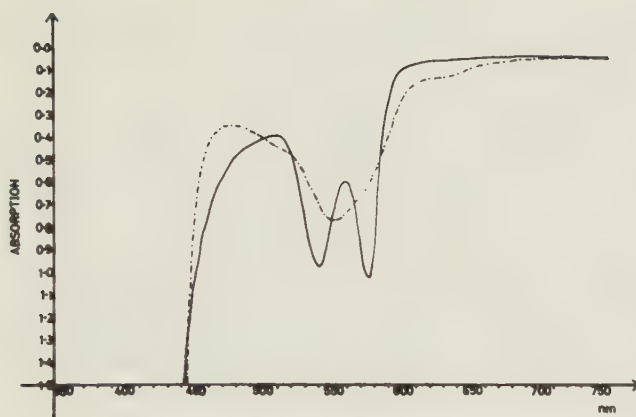


Abb. 8

Blutspektren

— 0,1 ml Blut ohne SO_2 in 10 ml Puffer pH 7,4
 -.-.-.- 0,1 ml Blut mit 30 mg SO_2 in 10 ml Puffer pH 7,4

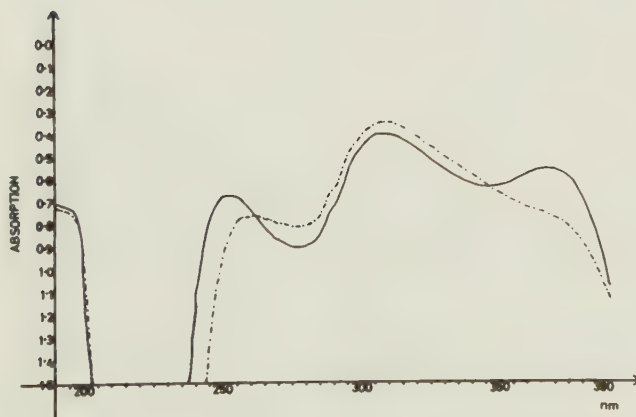


Abb. 9

UV - Spektren von

— 0,1 ml Blut ohne SO_2 in 10 ml Puffer pH 7,4
 -.-.-.- 0,1 ml Blut mit 30 mg SO_2 in 10 ml Puffer pH 7,4

Anders lagen die Verhältnisse bei einer Verdünnung von 0,05 ml Blut in 10,0 ml Wasser. Nach Zusatz von 10,0 mg SO_2 ging das Oxyhämoglobinspektrum in das Hämoglobinspektrum über. Nach 24 Stunden war das Hämoglobin in der gleichen Lösung in das Methämoglobin übergegangen. In der Blutverdünnung ohne SO_2 war das Oxyhämoglobinspektrum nach 24 Stunden noch erhalten, Abb. 10. Die Spektren wurden im Zeiss Spektralphotometer PM QII aufgenommen. Die Soretbande wurde 1:2 verkleinert. Auffallend war, daß auch hier das Maximum bei 350 nm verschwunden war. Das SO_2 hatte zunächst das Oxyhämoglobin zum Hämoglobin reduziert. Seine Reduktionskraft reichte aber nicht aus, eine Weiteroxidierung des Hämoglobins zum Methämoglobin zu verhindern oder das gebildete Methämoglobin zu reduzieren.

Um die Wirkung des Sulfits auf das sauerstofffreie Hämoglobinspektrum zu untersuchen, wurde das Blut mit Stokes Reagenz reduziert. Für Stokes Reagenz wurden 1,0 g Ferrosulfat in 10,0 ml Wasser gelöst. In dieser Lösung wurden 1,0 g Weinsäure gelöst und 6,0 ml verdünnter Ammoniak zugefügt. Das Hämoglobinspektrum wurde von einer Lösung, die 0,1 ml Blut und 1,0 ml Stokes Reagenz enthielt und mit Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt war, gegen eine Blindlösung von 1,0 ml Stokes Reagenz und 9,0 ml Wasser im Perkin-Ellmer Spektralphotometer aufgenommen. Der Einfluß des SO_2 wurde in einer Lösung, die 0,1 ml Blut, 1,0 ml Stokes Reagenz und 2,0 ml Sulfidlösung = 10 mg SO_2 in 10,0 ml Wasser enthielt, gegen eine Blindlösung der gleichen Zusammensetzung, aber ohne Blut, gemessen. Der Messung ging eine Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C voraus. Für das UV-Spektrum wurden die Lösungen 1:10 verdünnt.

Das Hämoglobinspektrum zeigte im sichtbaren Bereich keine Veränderung (Abb. 11). Die Soretbande war in der 1:10 Verdünnung meßbar. In der sulfithaltigen Probe war das Maximum der Soretbande zurückgegangen, aber nicht verschoben. Sonst zeigten sich keine spektralen Veränderungen. Das UV-Spektrum (Abb. 12) zeigte in der sulfithaltigen Probe kaum eine Veränderung des Proteinmaximums bei 275 nm, während das Porphyrin-

maximum bei 350 nm wiederum verschwunden war. Die Spektren in Abb. 11 und 12 wurden im Perkin-Ellmer Spektralphotometer aufgenommen.

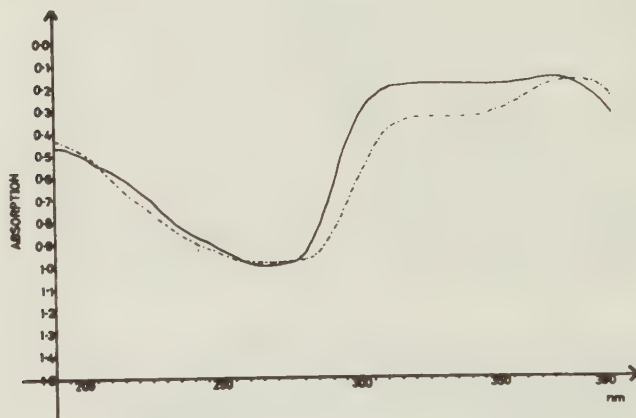


Abb. 12 UV-Spektrum von 0,1 ml Blut in 10 ml H_2O ,
reduziert mit Stokes Reagenz und 1:10 verdünnt
-.-.-.-.- ohne SO_2
———— mit 10 mg SO_2

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch die Reduktion des Oxyhämoglobins zum Hämoglobin durch Sulfid das Proteinmaximum bei 275 nm abnimmt. Das Porphyrinmaximum bei 350 nm wird im sauerstoffhaltigen und im reduzierten Blut durch Sulfid zum Verschwinden gebracht, was auf eine Veränderung am Porphyrin schließen läßt. Eine Abnahme des Oxyhämoglobinspektrums in einer verdünnten und gepufferten Blutlösung ließ sich erst bei einer Konzentration von 4 mg SO_2 auf 0,1 ml Blut beobachten. Die Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff kann anscheinend von kleinen Mengen Sulfid nicht gemindert werden. Eine Sauerstoffabgabe des Oxyhämoglobins, bewirkt durch Sulfid im Blut, ist daher sehr unwahrscheinlich, was nicht ausschließt, daß die Verhältnisse in vivo anders liegen. Es kann gut möglich sein, daß Sulfid an den Stellen im Blut oxidiert wird, wo das Oxyhämoglobin einen Teil seines Sauerstoffs infolge des niedrigeren O_2 -Partialdrucks im Gewebe abgibt.

W. S c h e l e r (74) hatte festgestellt, daß das Zentralion in Hämoglobinderivaten Liganden wie N_3^- , OCN^- , SCN^- , CN^- , F^- binden kann. Die Ligandenbindung wurde besonders bei den Derivaten beobachtet, die als Zentralion das dreiwertige Eisen haben, wie Methämoglobin, Katalase, Peroxydase und Cytochrom c. Durch spektralphotometrische Titration wurde nachgewiesen, daß im Methämoglobin eine Tetraaquostruktur vorliegt. Alle Hämoglobinderivate, denen die Möglichkeit gegeben wird, eine Tetraaquostruktur auszubilden, können Liganden binden. Dies gilt auch für das proteinfreie Farbstoffmolekül, das Häm. Die Ligandenbindung soll gesetzmäßig erfolgen und zwar entsprechend der Stärke der Elektronennegativität der Liganden. Abweichungen traten nur bei großen Liganden auf, wie Azetat, Propionat und Imidiazol. Durch die Ligandenbindung werden die Dissoziationskonstanten der Aminosäuren im Protein verschoben. So wird bei der O_2 -Bindung das Hämoglobin eine stärkere Säure. W. S c h e l e r et al. (76) konnten feststellen, daß Formaldehyd keine spektralen Veränderungen im sauren Methämoglobinspektrum hervorrufen konnte, daß sich aber das alkalische Methämoglobinspektrum auf Formaldehydzusatz dem sauren Spektrum näherte. Sie konnten aber nachweisen, daß Formaldehyd die Affinität des Methämoglobins gegenüber Azid als Ligand verringerte. Das Formaldehyd mußte also irgendwo im Proteinmolekül gebunden worden sein.

Als eine Ligandenbindung an das Myoglobin konnte auch der Röntgenvorgang beim Pökeln von K. F i s c h b a c h (77) erklärt werden. Durch Reduktion mit reduzierenden Bakterien und mit fleischeigenen Reduktasen soll aus dem Nitrat-Nitritgemisch des Pökelsalzes Stickoxid NO abgespalten werden, das mit dem Myoglobin ein Stickoxy-myoglobin bildet. Dieses gibt beim Sterilisieren ein Nitrosohämochromogen, das beständig ist und eine schöne rote Farbe besitzt.

Es sollte nun untersucht werden, ob das Sulfit eventuell auch eine Bindung als Ligand mit dem Hämoglobin eingehen kann. In Abbildung 10 und 11 war zwar keine spektrale Veränderung nach Sulfitzusatz aufgetreten, die auf eine Ligandenbindung schließen ließ.

Es wurden aber noch einige Versuche unternommen, um in Methämoglobin- und in Häminlösungen die Veränderungen durch Sulfit zu studieren.

5,0 ml Blut wurden mit Wasser auf 50,0 ml verdünnt und tropfenweise mit gesättigter Kaliumferricyanidlösung versetzt, bis alles Oxyhämoglobin ins Methämoglobin übergeführt worden war. Dann wurden je 4 ml der Verdünnung = 0,4 ml Blut mit 0,3 ml einer 2%igen Natriumsulfitlösung = 1,8 mg SO_2 und mit 0,5 ml = 3,0 mg SO_2 versetzt und die beiden Proben auf 10,0 ml mit Wasser aufgefüllt.

In gleicher Weise wurden 4 ml des verdünnten und oxidierten Blutes mit 0,3 ml einer 1%igen Natriumnitritlösung versetzt = 4,0 mg NO_2^- und auf 10,0 ml aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Spektren im Zeiss Spektralphotometer aufgenommen. Bei der Probe mit 3,0 mg SO_2 war eine Trübung zu beobachten, welche die Extinktion erhöhte.

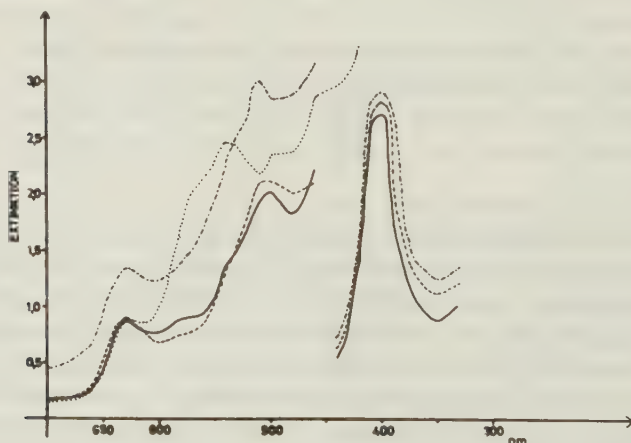


Abb. 13 0,4 ml Blut mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ oxidiert in 10 ml H_2O

————	Methämoglobinspektrum
-----	Methämoglobinspektrum + 1,8 mg SO_2
-.-.-.-.	Methämoglobinspektrum + 3,0 mg SO_2
.....	Methämoglobinspektrum + 4,0 mg NO_2^-

Soretbande 1:2 verkleinert

Wie in Abb. 13 zu sehen ist, vermag nicht nur NO eine Reaktion mit den Hämoglobinderivaten einzugehen, sondern auch NO_2^- . Das Nitrit veränderte eindeutig das Methämoglobinspektrum. Durch Ligandenbindung können entweder die Maxima verschoben werden, oder es kann eine Änderung des Typs auftreten (74). Durch das Nitrit trat eine Verschiebung des Methämoglobinmaximums bei 500 nm auf 540 nm auf. Es hatte sich ein rotes NO_2 -Methämoglobin gebildet, das nach D. Keilin und E.F. Hartree (78) instabil ist und unter langsamer Autoreduktion in NO_2 -Hämoglobin übergeht.

Eine Beeinflussung der Methämoglobinspektren durch Sulfid ist dagegen nicht so deutlich. Die Hauptmaxima des Methämoglobins bei 630 und 500 nm wurden durch Sulfid nicht verändert. Es trat nur eine Abschwächung der Nebenmaxima auf, was einen Übergang zum 4 bandigen Typ entsprach, der im sauren Milieu auftritt.

Die Soretbande für das NO_2 -Methämoglobin war nicht mehr meßbar. Die Soretbande der sulfidhaltigen Proben unterschieden sich kaum von der Soretbande des Methämoglobins. Bemerkenswert war aber, daß dem, durch $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ oxidiertem Hämoglobin ebenfalls das Maximum bei 350 nm fehlte. Dieses Maximum scheint einer leicht beeinflussbaren Stelle des Porphyrinmoleküls zu entsprechen, das sowohl von Oxidationsmitteln als auch Reduktionsmitteln wie SO_2 , aber nicht von Ferrosulfat beeinflusst wird.

W. Scheler und I. Fischbach (79) hatten die Ligandenbindung auch am Hämin beobachten können, wenn sie die Bedingungen für die Ausbildung einer Tetraaquostruktur schafften.

Sie erhielten mit den Liganden : H_2O , F^- , N_3^- den 5 bandigen Typ, mit den Liganden : Imidazol und Cyanid den 3 bandigen Typ.

Es sollte nun das Hämin und seine Veränderung durch Sulfid untersucht werden, damit eine eventuelle Reaktion des Sulfids mit der Eiweißkomponente ausgeschaltet werden konnte.

Hämin wurde durch Eintropfen von defibriniertem Blut in, auf 100°C erhitzten Eisessig, der eine kleine Menge gesättigte Natriumchloridlösung enthielt, hergestellt (80).

Man erhält so das Hämin in kleinen, dunkelbraunen, nadelförmigen Kristallen (Abb. 14).

Zur Ausbildung der Tetraaquostruktur wurde das Hämin in einer Mischung von 4 ml H_2O mit 6 ml Dimethylformamid gelöst. Das Hämin löste sich nur schwer in dieser von Scheler (79) angegebenen Mischung. Obwohl eine gesättigte Lösung des Hämins hergestellt wurde, war die Extinktion im Bereich des Sichtbaren sehr gering und die Unterschiede leider nicht so deutlich sichtbar.

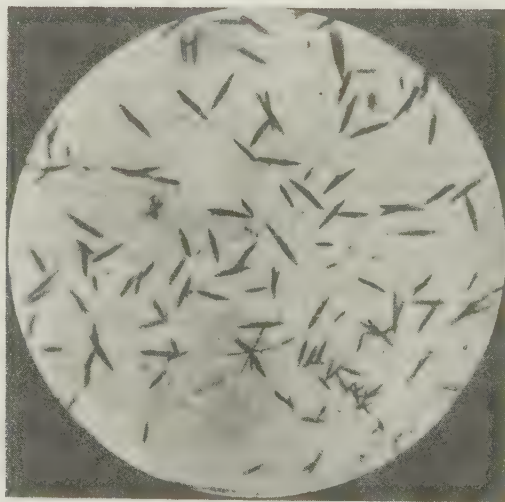


Abb. 14 Häminkristalle

Der Häminlösung wurde soviel Natriumsulfit und Kaliumcyanid zugegeben, daß je eine 1 M Lösung von SO_2 und CN^- entstand. Die Spektren wurden im Perkin-Elmer Spektralphotometer aufgenommen. Das Cyanid führte eine deutliche Verschiebung der Absorptionsmaxima herbei. Das Sulfit brachte die Maxima des

Aquohämins bei 630 und 500 nm zum Verschwinden und zeigte dafür eine breite Schulter zwischen 650 und 550 nm. Die Soretbande bei 400 nm, die beim Aquohämin nicht mehr meßbar war, wurde durch das Sulfit stark verkleinert. Es trat aber keine Verschiebung wie beim Cyanid auf (Abb. 15).

Da sich in der Mischung 4 ml H_2O und 6 ml Dimethylformamid das Hämin schlecht löste, wurde eine Mischung von 4 ml H_2O und 10 ml Dimethylformamid bereitet und das Hämin darin gelöst. Der pH-Wert änderte sich in dieser Lösung nur um 0,4 und betrug 6 gegenüber der ersten Lösung von pH 5,6. Die Mischung wurde mit soviel Natriumsulfit und Natriumfluorid versetzt, daß wieder eine 1 M Lösung von SO_2 und F^- entstand. Wie Abb. 16 zeigt, war in dieser Lösung das Häminspektrum deutlich ausgeprägt. Die Maxima stimmten mit jenen von Scheler angegebenen bei 622,5, 575, 540 und 501 fast genau überein. Auf Zusatz von Sulfit konnten sie aber nicht verändert werden. Dagegen rief der Zusatz von Fluorid eine deutliche Verschiebung der Maxima hervor.

Diese Spektren wurden im Zeiss Spektralphotometer aufgenommen. Die Soretbanden bei 400 nm waren nicht mehr meßbar. Von einer Verdünnung wurde wegen einer eventuellen Verschiebung der Bindungsverhältnisse abgesehen.

Es wird angenommen, daß das Auftreten der breiten Schulter zwischen 650 und 550 nm in der sulfithaltigen Häminlösung, die mit einem Dimethylformamid-Wasser-Gemisch im Verhältnis 6:4 bereitet wurde, eine Reduktion des Hämins anzeigt.

Aus den Ergebnissen, die nur für NO_2^- , CN^- und F^- eine eindeutige Ligandenbindung anzeigten, kann geschlossen werden, daß das Sulfit nicht als Ligand an das Eisen des Hämoglobin- und des Häminmoleküls gebunden wird.

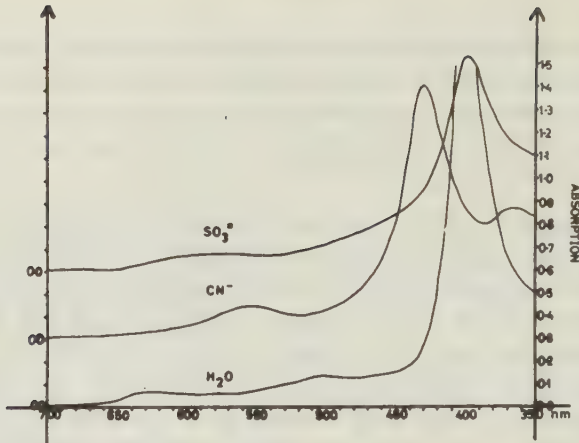


Abb. 15

H_2O = Häm in Dimethylformamid/Wasser (6:4) gelöst

CN^- = Häm in Dimethylformamid/Wasser (6:4) gelöst + 1 M CN^-

SO_3^{2-} = Häm in Dimethylformamid/Wasser (6:4) gelöst + 1 M SO_2

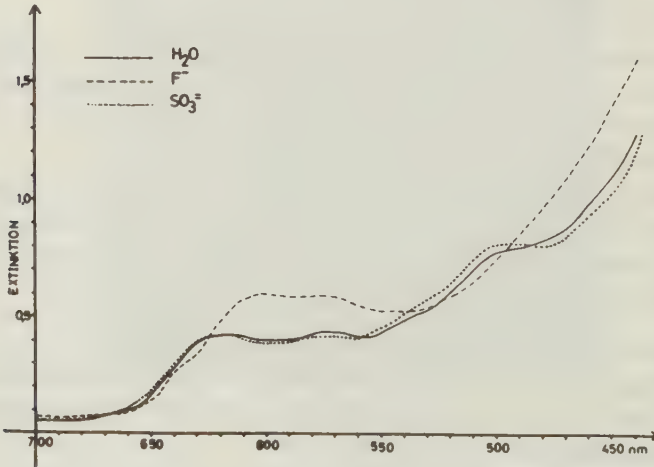


Abb. 16

H_2O = Häm in Dimethylformamid/Wasser (10:4) gelöst

SO_3^{2-} = Häm in Dimethylformamid/Wasser (10:4) gelöst + 1 M SO_2

F^- = Häm in Dimethylformamid/Wasser (10:4) gelöst + 1 M F^-

5. U n t e r s u c h u n g d e r W i r k u n g d e s S u l -
f i t s a u f D i s u l f i d v e r b i n d u n g e n ,
i n s b e s o n d e r e a u f d a s B l u t u n d d i e P r o t e i n -
k o m p o n e n t e d e s H ä m o g l o b i n s .

Die bekannten Reaktionen des Sulfit mit Disulfiden (4, 5), die zur Aufspaltung der S-S-Bindung führen und in der Bildung einer Sulfhydrylgruppe und eines S-Sulfonates resultieren, ließen an eine ähnliche Reaktion des Sulfit mit den Proteinen des Blutes denken.

J.L. B a i l l e y und R.D. C o l e (6) konnten neben Cystin auch Proteine wie Insulin, Ribonuclease, Trypsinogen und Chymotrypsinogen mit Sulfit aufspalten. Eine quantitative Umsetzung erreichten sie zwar bei pH 7,4 nur mit einem 10-50 fachen Überschuß an Sulfit, bezogen auf die vorhandenen Disulfidgruppen und durch die Entfernung der entstandenen Sulfhydrylgruppen aus dem Reaktionsgleichgewicht. Ferner führten sie die Reaktion in 8 M Harnstoff aus, wodurch die Proteine teilweise denaturiert wurden.

A. S c h ö b e r l und E. L u d w i g (81) gelang die quantitative Umsetzung von Cystin nur mit der 300 fachen Menge an Sulfit. Es wurde ferner festgestellt, daß die Aufspaltung der Disulfidgruppen von verschiedenen Aminosäuren sehr pH-abhängig ist (82).

Es wurde daher versucht, nachzuweisen, ob der Zusatz von Sulfit zu Blut oder zu dem, aus dem Hämoglobin abgespaltenen Globin eine Zunahme der Sulfhydrylgruppen hervorruft.

Dazu mußte eine anwendbare Methode gefunden werden, um die SH-Gruppen zu bestimmen.

Die bekannteste Bestimmungsmethode für SH-Gruppen ist die nach P.D. B o y e r (27) mit p-Chlormercuribenzoat.

Boyer stellte fest, daß das Absorptionsmaximum des p-CMB bei 230-235 nm bei Anwesenheit von Sulfhydrylgruppen ansteigt, durch die Bildung von Merkaptiden. Die Extinktionszunahme bei

230-235 nm ist verhältnismäßig gering. Mißt man aber die Extinktionsänderung bei 250 nm, so ist diese beträchtlich grösser, und man erhält proportional der SH-Konzentration einen linearen Anstieg der Extinktion. Der lineare Anstieg ist darauf zurückzuführen, daß das Merkaptid nicht dissoziiert ist. Die Reaktion kann nach Boyer bei pH 4,6 und pH 7,0 durchgeführt werden. Bei pH 7 stellte Boyer allerdings eine geringe Dissoziation der Cystein-Hg-Verbindung fest. Nach Boyer kann die Reaktion ferner von Fremdionen beeinflusst werden. Er stellte eine Extinktionserhöhung durch Karbonat, Chlorid, Acetat und Sulfat fest. Das schwerlösliche p-CMB soll als undissoziiertes Hydroxyd vorliegen, das sich mit verschiedenen Anionen zu assoziieren vermag und so die Extinktion erhöht. Auch bei Proteinen konnte er durch unbekannte Verunreinigungen eine Extinktionserhöhung beobachten. Boyer stellte aber fest, daß die Fremdionen keinen Einfluß auf die stöchiometrische Umsetzung des p-CMB mit den SH-Gruppen haben. Für eine quantitative Bestimmung der SH-Gruppen muß daher die völlige Absättigung des vorgelegten p-CMB mit SH-Gruppen erfolgen, die sich dann in keiner weiteren Extinktionserhöhung bemerkbar macht.

In eigenen Versuchen wurde festgestellt, daß auch Sulfit, Thiosulfat, Sulfide, Dithionat und Cystin die Extinktion von p-CMB erhöhen konnten. Bei Sulfat dagegen wurde keine Extinktionserhöhung beobachtet. Es assoziieren sich wahrscheinlich nur solche S-Verbindungen mit dem p-CMB, die noch ein freies Elektronenpaar besitzen. Die sich bildenden Verbindungen mit dem p-CMB sind wahrscheinlich stark dissoziiert, da keine stöchiometrische Umsetzung erfolgte. Die vollständige Bindung des Sulfits erforderte ein vielfaches der äquivalenten Menge von p-CMB und war von dessen Konzentration abhängig. Bei geringen Konzentrationen an p-CMB wurde mehr Sulfit zur vollständigen Bindung gebraucht. Es vermochte dadurch zwar die Extinktion zu erhöhen, aber die stöchiometrische Umsetzung z.B. vom Cystein mit p-CMB nicht zu stören.

Trotzdem war eine Bestimmung der SH-Gruppen im Blut mit der Boyer-Methode nicht möglich, da zur vollständigen Absättigung soviel Blut gebraucht wurde, daß durch dessen Eigenabsorption eine spektralphotometrische Bestimmung nicht mehr möglich war.

Es wurde daher vom Hämoglobin die Farbstoffkomponente abgespalten und das erhaltene Globin auf seinen Sulfhydrylgehalt untersucht. Zur Herstellung des Globins wurde frisches Menschenblut durch Zentrifugieren vom Serum befreit. Die erhaltene Erythrocytensuspension wurde mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und die Erythrocyten darauf mit dem doppelten Volumen Wasser hämolysiert. Die hämolysierte Lösung wurde zur Abtrennung der Membranen nochmals zentrifugiert. Die erhaltene Oxyhämoglobinlösung wurde in die 10 bis 20 fache Menge Aceton, das 1/2% an HCl enthielt, eingegossen. Das Hämoglobin spaltete sich sofort in Globinhydrochlorid, das ausfiel und in Hämin, das in Lösung blieb, auf. Die Eiweißausfällung wurde abgesaugt, mit Aceton nachgewaschen und das restliche Aceton durch Evakuieren entfernt. Das Globinhydrochlorid wurde in destilliertem Wasser gelöst und einmal durch 1/3 Sättigung mit Ammonsulfat und einmal mit Natronlauge durch Neutralisation gefällt. Das durch Neutralisation gefällte Globin löste sich leichter wieder in Wasser auf, als das mit Ammonsulfat gefällte (83).

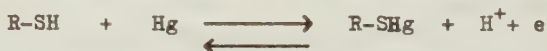
Es kann hier erwähnt werden, daß die mit Sulfit versetzte Globinlösung nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C und anschließender Destillation kein Sulfit oxidiert hatte.

Um möglichst physiologische Bedingungen einzuhalten, wurde versucht, die SH-Gruppen des Globins mit der Boyer-Methode bei pH 7 zu bestimmen. Die Bestimmung war nicht möglich, da das Globin im Phosphatpuffer bei pH 7 ausfiel.

Es wurde daher der Versuch unternommen, die Sulfhydrylgruppen polarographisch zu bestimmen. Die Versuche wurden zunächst probeweise mit Cystein- und Cystinlösungen durchgeführt. Eine Bestimmung von Cystin und Cystein nebeneinander mit Hilfe der, durch Cystin oder Cystein verursachten katalytischen Wasser-

stoffabscheidung in einer gepufferten Kobalt II-Salzlösung nach der Vorschrift von M. B f e z i n a und P. Z u m a n (84) schlug fehl. Cystin wird an der Quecksilber-Tropfelektrode bei positiven Potentialen zu Cystein reduziert, dessen Sulfhydrylgruppe die eigentlich katalytisch wirksame Komponente dieses Systems ist. Eine Unterscheidung von Cystein und Cystin in einer Lösung ist daher nicht möglich.

Verbindungen, die an der Tropfelektrode Elektronen abgeben können und so der Oxidation unterliegen, äußern sich auf den polarographischen Kurven als anodische Stufen. Ähnlich liefern anodische Stufen auch Stoffe, die mit Quecksilberionen wenig lösliche oder komplexe Verbindungen bilden. Bei diesen Vorgängen ist die Quecksilbertropfelektrode die Anode. So zeigen Sulfhydrylstoffe und ihre Oxidationsprodukte an der Hg-Tropfelektrode anodische Depolarisation. Man beobachtete (84) bei der Aufnahme der polarographischen Kurven in gepufferten Lösungen bei niedrigen Konzentrationen an Sulfhydrylstoffen eine einzige Stufe. Bei der Überschreitung der Konzentration von 1×10^{-4} M wächst diese Stufe nicht mehr an. Es tritt eine neue Stufe bei positiveren Potentialen auf, und die Summe beider Stufen ist eine lineare Funktion der Konzentration. Die Summe beider Stufen entsprach der Abgabe eines Elektrons. B f e z i n a und Z u m a n nahmen an, daß es sich um die Reaktion



handelt. Die negativere Stufe entspricht der Bildung des Hg-Salzes R-SHg, das an der Oberfläche absorbiert wird, die positivere Stufe der Bildung des Salzes, das von der Oberfläche wahrscheinlich durch Diffusion entfernt wird. Die Unabhängigkeit des Halbstufenpotentials von der Thiolkonzentration steht im Einklang mit dem Mechanismus. In diesen Fällen, wo das Halbstufenpotential konzentrationsunabhängig ist, muß das primäre Elektrolysenprodukt ein ziemlich löslicher Komplex sein. Bei der Bildung schwerlöslicher Komplexe müßte das Halbstufenpotential immer eine Funktion der Konzentration sein. Die positivere Stufe ist pH-abhängig. Bei Konzentrationen über 3 bis 5×10^{-4} M wurde beobachtet, daß sie keine lineare

Funktion der Konzentration mehr darstellt. Die Stufe strebt einem pH-abhängigen Grenzwert zu. Der Grund dafür ist in der Inaktivierung der Elektrodenoberfläche durch die Bildung eines unlöslichen Quecksilbersalzfilmes zu suchen, der sich von dem, bei der ersten Absorptionsstufe gebildeten Absorbat unterscheiden muß.

Die anodischen Stufen von Sulfhydrylgruppen werden also durch Absorption von $\text{Hg} - \text{S} - \text{R}$ an der Quecksilberelektrode hervorgerufen. Ist dieser Komplex unlöslich, ist das Halbstufenpotential abhängig von der Konzentration. Die anodischen Stufen der Sulfhydrylstoffe sind pH-abhängig.

Nach K. S c h w a b e (85) liegen die anodischen Stufen für Cystein und Cystin bei verschiedenen pH-Werten folgendermaßen:

Puffer	pH	Cystin	Cystein
Acetatpuffer	3,8	- 0,72 V	- 0,30 V
Phosphatpuffer	7,0	- 0,83 V	—————
$\text{NH}_3 / \text{NH}_4\text{Cl}$	9,5	- 1,05 V	- 0,59 V

Es wurden in verschiedenen Puffern die Stufen von Cystin und Cystein ermittelt. Den Proben wurde darauf Sulfit zugesetzt, um zu sehen, ob sich die Stufen auf Sulfitzusatz verändern.

Ein Probenansatz enthielt:

1×10^{-6} Mol Cystein bzw. Cystin

in 10,0 ml Puffer. Jeder Probe wurden $7,15 \times 10^{-5}$ Mol SO_2 zugefügt. Im Acetatpuffer von pH 5,6 traten bei Cystin zwei Stufen auf, bei -0,8 V und bei -0,35 V. Nach Sulfitzusatz veränderten sich die Stufen nicht. Es trat aber eine neue Stufe bei -0,65 V auf. Cystein hatte eine Stufe bei -0,42. Auf Zusatz von Sulfit erschien wiederum eine Stufe bei -0,65 V, während die Cysteinstufe unverändert blieb. Ein Gemisch von Cystein und Cystin hatte zwei Stufen bei -0,8 und bei -0,35 V. Zusatz von Sulfit ergab die neue Stufe bei -0,65 V und ließ die beiden anderen Stufen unverändert. Das Sulfit scheint bei diesem pH-Wert ebenfalls einen Komplex mit dem Quecksilber zu bilden, der eine anodische Stufe bei -0,65 V bildet.

In M/15 Phosphatpuffer pH 7,2 zeigte die Cysteinlösung eine Stufe bei -0,48 V, die Cystinlösung zwei Stufen bei -0,85 und -0,48 V. Nach Zusatz von Sulfit zur Cysteinlösung blieb die Cysteinstufe unverändert. Es trat keine neue Stufe auf. Nach Zusatz von Sulfit zur Cystinlösung verschwand die Cystinstufe bei -0,85 V. Die Stufe bei -0,48 V blieb unverändert bestehen.

Im $\text{NH}_3 / \text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer von pH 9,5 hatte Cystin eine große Stufe bei -0,98 V und eine kleine bei -0,52 V. Nach Zusatz von Sulfit nahm die Stufe bei -0,98 V ab und die Stufe bei -0,52 V zu. Das Cystein verfügte nur über eine Stufe bei -0,52 V. Nach Sulfitzusatz trat keine Veränderung dieser Stufe auf.

In einem Gemisch von Cystein und Cystin wurden 2 Stufen bei -1,0 und bei -0,52 V ermittelt. Nach Zusatz von Sulfit nahm die Stufe bei -1,0 V ab und die bei -0,52 V zu.

Es konnte also nur im alkalischen Puffer bei pH 9,5 eine Reduktion des Cystins durch Sulfit verfolgt werden.

Die Übertragung der beim Cystin verfolgten Reduktion durch Sulfit auf Blut, Serum, Globin- und Enzymlösungen scheiterte, da die Konzentration an Sulfhydrylgruppen oder Disulfidverbindungen in diesen Lösungen zu gering waren, um polarographisch mit der anodischen Stufe erfaßt werden zu können.

Sulfhydrylgruppen können in gepufferten Lösungen auch mit N-Äthylmaleinimid (NÄM) bestimmt werden (86). NÄM reagiert im Überschuß stöchiometrisch mit Sulfhydrylgruppen. Die Reaktion kann durch die Abnahme der NÄM-Absorption bei 300 nm verfolgt werden. Der Mechanismus der Reaktion des NÄM mit den SH-Gruppen ist nicht bekannt.

Nach J. B r o e k h u y s e n (87) ist die Abnahme der Extinktion auf die Zerstörung der zentralen Doppelbindung zurückzuführen und daraus folgend auf das Verschwinden der Konjugation. Eine Verbindung mit den beiden C = O - Gruppen allein ist unwahrscheinlich, da diese zwei Gruppen nur eine molare Extinktion von einigen 10 Einheiten haben. Nach J. D. G r e g o r y ist die Absorption des NÄM abhängig vom pH-Wert. Sie nimmt mit steigendem pH-Wert ab, da eine Hydrolyse der Imidbindung eintritt (88).

N.M. A l e x a n d e r (89) hatte mit NÄM Sulfhydrylgruppen in einem enteweißten Rattenleberextrakt und in Blut nachgewiesen. Er führte die Reaktion in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 aus mit 0,001 M NÄM. In 1 cm Küvetten bestimmte er die Extinktion der 0,001 M NÄM-Lösung in Puffer. Als Blindwert diente der Puffer. Die Sulfhydrylgruppen wurden in einer Lösung bestimmt, welche die gleiche NÄM-Konzentration, die sulfhydrylhaltige Probe und den Puffer enthielt. Als Blindwert diente die Lösung mit gleicher Zusammensetzung, aber ohne NÄM. Die Absorption der sulfhydrylhaltigen Probe bei 300 nm subtrahierte Alexander von der Absorption der reinen NÄM-Lösung. Die Differenz dividierte er durch den molaren Extinktionskoeffizienten des NÄMs und erhielt in dem Quotient die molare Konzentration der, mit dem NÄM reagierten Sulfhydrylgruppen. Bei einer NÄM-Konzentration von 0,001 M konnte die nachzuweisende Sulfhydrylkonzentration 0,0001 bis 0,0009 M betragen. Es können daher mit dieser Methode 1%ige Proteinlösungen, die eine reaktionsfähige Sulfhydrylgruppe pro ein Molekulargewicht von 100 000 aufweisen noch bestimmt werden, da dann die Sulfhydrylkonzentration 0,0001 M ist. Dies ist die Grenze der Methode. Damit ist sie unempfindlicher als die Methode nach Boyer.

Zur Blutuntersuchung verdünnte Alexander hämolysiertes Blut 1:5 mit 5%iger Metaphosphorsäure und filtrierte von der Eiweißfällung ab. 2 ml des Filtrates versetzte er mit 4 ml 1 M Phosphatpuffer pH 6,8. Die hohe Konzentration des Phosphatpuffers diente zur Neutralisation der Metaphosphorsäure. Die Konzentration des Phosphatpuffers hatte keinen Einfluß auf den molaren Extinktionskoeffizienten. Der molare Extinktionskoeffizient des NÄM betrug bei 300 nm 620. Alexander versetzte das mit Puffer neutralisierte Blutfiltrat mit NÄM-Lösung und bestimmte die Absorptionsdifferenz. Er konnte in 1 ml Blut 1,87 μ Mole an Sulfhydrylgruppen nachweisen. In eigenen Versuchen wurden in 1 ml Blut 1,71 μ Mole Sulfhydrylgruppen bestimmt.

Bei der Prüfung, ob ein Zusatz von Sulfit die Sulfhydrylgruppen im Blut ansteigen läßt, wurde festgestellt, daß auch das Sulfit mit dem NÄM reagiert. Bei der Untersuchung der stöchiometrischen Umsetzung von Sulfit und Cystein mit NÄM ergaben sich folgende Ergebnisse (Abb. 17).

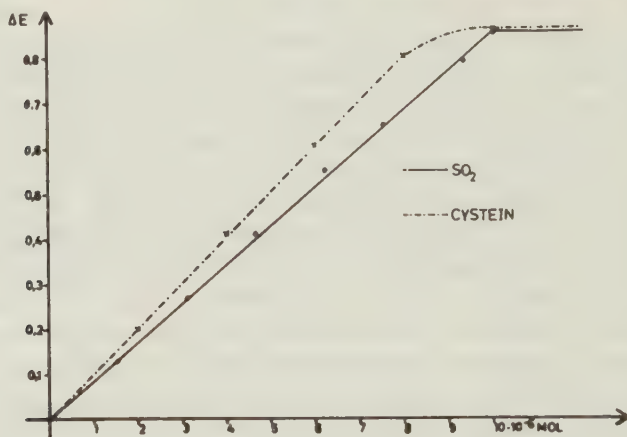


Abb. 17 Extinktionsänderung von 1×10^{-5} Mol NÄM durch Konzentrationen von 1×10^{-6} bis 1×10^{-5} Mol an Cystein und SO_2 in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8

Die Reaktion von Natriummetabisulfitlösung, ausgedrückt in Mol SO_2 mit 1×10^{-5} Mol NÄM verläuft linear auch bei einem geringen Überschuß an NÄM. Die Reaktion von Cystein mit NÄM dagegen ist bei geringem NÄM-Überschuß nicht mehr ganz linear. Es ist anzunehmen, daß die Cystein-NÄM-Verbindung etwas dissoziiert ist. Es besteht auch ein kleiner Unterschied im Verlauf der Bindung von SO_2 und Cystein an das NÄM. Bei der gleichen Extinktionsänderung wurden mehr SO_2 -Moleküle als Cysteinmoleküle zur Bindung verbraucht. Dies spricht auch dafür, daß die NÄM-Cystein-Verbindung etwas dissoziiert ist.

Da auch das Sulfit mit dem NÄM reagiert, war es mit dieser Methode nicht möglich, eine definitive Aussage zu machen, ob nun das Sulfit Disulfidgruppen im Blut angreift oder nicht. Es wurden aber einige orientierende Versuche durchgeführt.

Mit Sulfit versetztes und im Thermostaten bei 37°C für eine Stunde belassenes Blut wurde nach der Methode von Alexander mit Metaphosphorsäure versetzt, filtriert und mit Phosphatpuffer neutralisiert. Die neutralisierte Lösung wurde mit NÄM versetzt und die Extinktionsabnahme gemessen. In gleicher Weise wurden unbehandeltes Blut und eine Sulfitlösung gleicher Konzentration bei 37°C inkubiert, mit Metaphosphorsäure behandelt, mit Puffer neutralisiert und die Extinktionsabnahme nach NÄM-Zusatz bestimmt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tab. 13

Probe	Zugesetztes SO_2 in Mol	Mit NÄM reagier- te S-Verbindung in Mol SO_2	Differenz in Mol SO_2
Blutfiltrat	0	$0,65 \times 10^{-6}$	$6,60 \times 10^{-6}$
SO_2 -Blutfiltr.	$8,0 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-6}$	
SO_2 -Lösung	$8,0 \times 10^{-6}$	$7,10 \times 10^{-6}$	
Blutfiltrat	0	$1,05 \times 10^{-6}$	$5,75 \times 10^{-6}$
SO_2 -Blutfiltr.	$7,1 \times 10^{-6}$	$1,80 \times 10^{-6}$	
SO_2 -Lösung	$7,1 \times 10^{-6}$	$6,50 \times 10^{-6}$	
Blutfiltrat	0	$1,60 \times 10^{-6}$	$2,85 \times 10^{-6}$
SO_2 -Blutfiltr.	$5,2 \times 10^{-6}$	$3,65 \times 10^{-6}$	
SO_2 -Lösung	$5,2 \times 10^{-6}$	$4,90 \times 10^{-6}$	

Die Differenz wurde errechnet indem die Werte, die für das SO_2 -Filtrat erhalten wurden, abzüglich der für das Blutfiltrat, von denen der SO_2 -Lösung subtrahiert wurden. Die Werte für das SO_2 -Blutfiltrat, abzüglich der Blutfiltratwerte hätten die gleichen sein müssen, wie für die SO_2 -Lösung. In dem Blutfiltrat war aber ein großer Verlust an SO_2 aufgetreten. Es konnte sein, daß der Verlust auf eine Oxidation des SO_2 zurückzuführen war. Durch die Säurebehandlung wurde der Blutsauerstoff in Freiheit gesetzt und konnte das SO_2 oxidieren. Es wurde deshalb in einem zweiten Versuch nicht das Blut selbst, sondern erst das nach der Säurebehandlung erhaltene Blutfiltrat mit Sulfit versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Tab. 14

Probe	Zugesetztes SO_2 in Mol	Mit NÄM reagier- te S-Verbindung in Mol SO_2	Differenz in Mol SO_2
Blutfiltrat	0	$0,95 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$
Blutfiltrat SO_2	$3,12 \times 10^{-6}$	$4,40 \times 10^{-6}$	
SO_2 -Lösung	$3,12 \times 10^{-6}$	$3,15 \times 10^{-6}$	
Blutfiltrat	0	$1,20 \times 10^{-6}$	$0,05 \times 10^{-6}$
Blutfiltrat SO_2	$3,12 \times 10^{-6}$	$4,30 \times 10^{-6}$	
SO_2 -Lösung	$3,12 \times 10^{-6}$	$3,15 \times 10^{-6}$	

Der Zusatz von SO_2 zum sauren Blutfiltrat ergab keinen Verlust an SO_2 . Damit war aber noch nicht geklärt, ob erstens tatsächlich keine Sulfhydrylgruppen durch das Sulfit entstanden sind, da bei der Bildung von SH-Gruppen auch die gleiche Menge an Sulfit als S-Sulfonatverbindung aus der Reaktionslösung verschwindet und von letzterer nicht bekannt ist, ob sie mit NÄM reagieren kann, und zweitens, ob das Sulfit tatsächlich vom Blutsauerstoff oxidiert wurde, oder aber an die Proteine gebunden, von der Metaphosphorsäure mit ausgefällt wurde.

Zur Klärung der Frage eins wurde Blut mit einem Überschuß der theoretisch oxidierbaren Sulfitmenge versetzt, eine Stunde bei 37°C inkubiert und mit Metaphosphorsäure versetzt. Durch die unfiltrierte Lösung wurde solange O₂-freier Stickstoff geleitet, bis im austretenden Gasstrom kein SO₂ mehr nachzuweisen war. Die Lösung wurde darauf filtriert und im Filtrat die SH-Gruppen mit NÄM bestimmt. Es wurde gegenüber einer gleich behandelten Blutprobe, die kein SO₂ enthielt, keine Veränderung im SH-Gehalt erhalten. In beiden Proben wurden $0,95 \times 10^{-6}$ als Mol SO₂ mit NÄM reagierende S-Verbindungen gefunden.

Zur Klärung der Frage zwei wurde eine Globinlösung, deren Darstellung früher beschrieben wurde (83), mit NÄM auf Sulphydrylgruppen geprüft. Die Prüfung verlief negativ. Mit Sulfit versetztes Globin ergab keinen Verlust an Sulfit gegenüber einer reinen Sulfitlösung, die der gleichen Prozedur unterzogen wurde. Der Verlust an Sulfit im Blut ist daher doch auf die Oxidation durch den Blutsauerstoff zurückzuführen. Nach dem Durchleiten von Stickstoff durch eine, mit Metaphosphorsäure versetzte SO₂-Globinlösung wurde im Filtrat keine Reaktion mit NÄM erhalten. Ein Zusatz von SO₂ zum sauren Globinfiltrat veränderte die ursprünglich zugesetzte Sulfitkonzentration nicht. Eine Übersicht über die, mit Globin erhaltenen, Ergebnisse gibt folgende Tabelle:

Tab. 15

Probe	Zugesetztes SO ₂ in Mol	Mit NÄM reagierende S-Verbindung in Mol SO ₂	N ₂ -Behandl.
Globinfiltr.	0	0	nein
SO ₂ -Globinfiltrat	$5,20 \times 10^{-6}$	$5,35 \times 10^{-6}$	nein
SO ₂ -Lösung	$5,20 \times 10^{-6}$	$5,20 \times 10^{-6}$	nein
Globinfiltr. + SO ₂	$4,06 \times 10^{-6}$	$4,20 \times 10^{-6}$	nein
SO ₂ -Globinfiltrat	$7,10 \times 10^{-6}$	0	ja

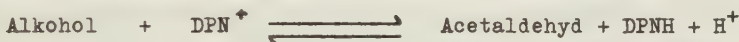
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit der Methode nach N.M. A l e x a n d e r (89) keine von Sulfit gebildeten Sulphydrylgruppen in Blut und in einer Globinlösung nachgewiesen werden konnten. Auch die Prüfung auf SH-Gruppen nach Vertreibung des störenden Sulfits mit N_2 aus den sauren Proteinlösungen verlief negativ. Die Ausfällung der Proteine mit Metaphosphorsäure führte zu keinem Verlust an Sulfit, außer der Oxidation durch den Blutsauerstoff. Dies schließt aber nicht aus, daß ursprünglich das Sulfit an die Proteine gebunden war und durch die Säure wieder aufgespalten wurde.

6. Untersuchung der Wirkung des Sulfit auf Alkohol-Dehydrogenasen.

Sulfit wird in größeren Mengen hauptsächlich durch geschwefelten Wein vom Organismus aufgenommen. Es wurde daher die Wirkung des Sulfit auf die Alkohol-Dehydrogenasen noch etwas eingehender untersucht.

Für die Untersuchung standen Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber und aus Hefe zur Verfügung. Beide wurden von der Firma Boehringer in Mannheim bezogen.

Alkohol-Dehydrogenasen katalysieren die Reaktion



Nach H.U. B e r g m e y e r (55) liegt das Gleichgewicht bei pH 7 auf der linken Seite. Im alkalischen Milieu und durch Abfangen des gebildeten Acetaldehyds mit Semicarbazid verläuft die Reaktion nahezu vollständig nach der rechten Seite.

G. P f l e i d e r e r et al. (34) konnte mit Sulfit die Hydrierung des Acetaldehyds, katalysiert durch Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe, nicht hemmen. Die gleiche Reaktion, katalysiert durch Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber, war mit 20 - 50 µ Sulfit zu 25% hemmbar. Die von Pfeleiderer verwendete Testzusammensetzung betrug bei der Hefe-Alkohol-Dehydrogenase = Hefe - ADH:

0,1 ml	Acetaldehyd	= 2,3 x 10 ⁻⁵ Mol
0,07 ml	DPNH	= 6,4 x 10 ⁻⁷ Mol
3,03 ml	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2;	

bei der Leber - ADH:

0,03 ml	0,5 M Acetaldehyd	= 1,5 x 10 ⁻⁵ Mol
0,04 ml	DPNH	= 4,0 x 10 ⁻⁷ Mol
1,94 ml	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2.	

Wie Pfeleiderer (34) schon berichtete, hatten die Enzymkonzentrationen keinen Einfluß auf die Beurteilung des Hemmeffekts, da die Hemmstoffkonzentration mehr als das 1000 fache der molaren Konzentration des Enzyms betrug.

Für die eigenen Hemmversuche wurde eine Testzusammensetzung gewählt, die weitgehend der, von Pfeleiderer angegebenen, entsprach.

Der Testansatz enthielt:

0,03 ml Acetaldehyd $= 1,5 \times 10^{-5}$ Mol
 0,04 ml DPNH $= 5,8 \times 10^{-7}$ Mol
 1,90 ml M/15 Phosphatpuffer pH 7,2.

Die Reaktion wurde gestartet mit 0,03 ml einer verdünnten Leber-ADH-Lösung $= 2,0 \times 10^{-11}$ Mol und die Zeit für die Abnahme der DPNH-Extinktion von 0,1 bei 366 nm im Photometer Eppendorf gestoppt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tab. 16

Sulfit-Konzentration in Mol SO_2	$\Delta E/\text{Min.}$	Hemmung in %
0	0,202	0
$7,80 \times 10^{-8}$	0,202	0
$1,56 \times 10^{-7}$	0,204	0
$7,80 \times 10^{-7}$	0,206	0
$1,56 \times 10^{-6}$	0,210	0
$0,78 \times 10^{-5}$	0,0843	58,3

Eine Hemmung der Reaktion war erst zu beobachten, als die Sulfitkonzentration in den Bereich der Aldehydkonzentration gekommen war. Es wurde daher an eine mögliche Substratreaktion, an eine Bindung des Acetaldehyds durch SO_2 gedacht, so daß nicht mehr genügend Acetaldehyd für die Reaktion zur Verfügung stand und es dadurch zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit kam. Es wurde der gleiche Test mit einer, von vornherein geringeren Acetaldehydkonzentration durchgeführt. Die Acetaldehydkonzentration betrug $0,5 \times 10^{-5}$ Mol gegenüber der früheren von $1,5 \times 10^{-5}$ Mol bei sonst gleicher Testzusammensetzung.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tab. 17

Sulfit-Konzentration in Mol SO_2	Δ E/Min.	Hemmung in %
0	0,178	0
$0,156 \times 10^{-5}$	0,135	24,2
$0,234 \times 10^{-5}$	0,0994	44,2
$0,390 \times 10^{-5}$	0	100,0

Die Geschwindigkeit der Reaktion war durch die geringere Aldehydkonzentration auch ohne Hemmstoff etwas verringert. Ein vollständiger Stillstand der Reaktion wurde durch $0,390 \times 10^{-5}$ Mol SO_2 erreicht bei einer Aldehydkonzentration von $0,5 \times 10^{-5}$ Mol.

In den folgenden Versuchen war die SO_2 -Konzentration in allen Testansätzen die gleiche, nämlich $0,78 \times 10^{-5}$ Mol SO_2 , während die Aldehydkonzentration in jedem Ansatz verändert wurde.

Tab. 18

Aldehydkonzentration in Mol	Δ E/Min. ohne SO_2	Δ E/Min. mit SO_2	Hemmung in %
$0,50 \times 10^{-5}$	0,281	0	100,0
$1,00 \times 10^{-5}$	0,257	0,0648	74,8
$1,05 \times 10^{-5}$	0,234	0,0766	67,3
$1,10 \times 10^{-5}$	0,231	0,0946	59,0
$1,20 \times 10^{-5}$	0,214	0,1145	46,5
$1,50 \times 10^{-5}$	0,212	0,1715	17,0

Die Hemmung durch gleiche Konzentrationen an Sulfit nahm mit steigender Aldehydkonzentration ab.

Bei der doppelten SO_2 -Konzentration von $1,56 \times 10^{-5}$ Mol wurden folgende Hemmergebnisse erzielt; zum Vergleich wurden die Hemmergebnisse mit der Hälfte an SO_2 - und Acetaldehydkonzentration ebenfalls angeführt.

Tab. 19

Aldehydkonzentration in Mol	SO ₂ -Konzentration in Mol	ΔE/Min. ohne SO ₂	ΔE/Min. mit SO ₂	Hemmung in %
2,00 x 10 ⁻⁵	1,56 x 10 ⁻⁵	0,222	0,0620	72,1
2,50 x 10 ⁻⁵	1,56 x 10 ⁻⁵	0,154	0,1285	16,5
1,00 x 10 ⁻⁵	0,78 x 10 ⁻⁵	0,257	0,6480	74,8
1,25 x 10 ⁻⁵	0,78 x 10 ⁻⁵	0,257	0,1715	33,5
2,00 x 10 ⁻⁵	0,78 x 10 ⁻⁵	0,220	0,1845	16,0

Es ist deutlich eine Abhängigkeit der Hemmwirkung von Sulfit von der Aldehydkonzentration festzustellen. Der Hemmeffekt des Sulfits ist bei doppelter SO₂- und Aldehydkonzentration genau so groß, wie bei den einfachen Konzentrationen. Geringe Abweichungen dürften auf die Dissoziation der Aldehyd-SO₂-Verbindung zurückzuführen sein.

Die Hemmungsversuche für die durch Hefe-ADH katalysierte Reaktion wurden in folgendem Testansatz durchgeführt:

0,04 ml Acetaldehyd = 2,0 x 10⁻⁵ Mol
 0,06 ml DPNH = 8,7 x 10⁻⁷ Mol
 2,90 ml M/15 Phosphatpuffer pH 7,2

Die Reaktion wurde mit 0,04 ml Hefe-ADH gestartet = 4 x 10⁻¹¹ Mol. Nach Zugabe von verschiedenen SO₂-Konzentrationen in Form einer Natriummetabisulfitlösung zu dem Testansatz wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tab. 20

SO ₂ - Konzentration in Mol	Δ E/Min.	Hemmung in %
0	0,2580	0
0,78 x 10 ⁻⁶	0,2520	0
1,56 x 10 ⁻⁶	0,1900	26,4
2,34 x 10 ⁻⁶	0,1225	52,5
3,12 x 10 ⁻⁶	0	100,0

Es wurde hierbei eine ca. 50%ige Hemmung durch eine Sulfitkonzentration hervorgerufen, die um 1/10 Mol niedriger lag, als die Acetaldehydkonzentration.

Die Reaktion wurde noch bei gleichbleibender Sulfitkonzentration von $3,12 \times 10^{-6}$ Mol SO_2 und verschiedenen Acetaldehydkonzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Tab. 21

Aldehydkonzentration in Mol	$\Delta E/\text{Min.}$ ohne SO_2	$\Delta E/\text{Min.}$ mit SO_2	Hemmung in %
$2,5 \times 10^{-5}$	0,333	0	100,0
$3,0 \times 10^{-5}$	0,268	0	100,0
$4,0 \times 10^{-5}$	0,316	0,1325	57,0
$5,0 \times 10^{-5}$	0,500	0,3570	28,5

Die Tabelle zeigt einmal, daß die Hemmung, hervorgerufen durch $3,12 \times 10^{-6}$ Mol SO_2 mit steigender Aldehydkonzentration abnimmt. Sie zeigt aber auch, daß die Reaktionsgeschwindigkeit im Testansatz ohne Sulfit mit steigender Aldehydkonzentration zunimmt. Es herrschten also bei den untersuchten Aldehydkonzentrationen keine optimalen Bedingungen, d.h. die Aldehydkonzentration reichte nicht aus, um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit hervorzurufen. Es wird angenommen, daß die angegebene Aldehydkonzentration nicht stimmte. Da es sich beim Acetaldehyd um einen leicht flüchtigen Stoff handelt, konnten irgendwelche Verluste eingetreten sein. Der Versuch konnte nicht wiederholt werden, da alle Hefe-ADH in noch zu beschreibenden Versuchen aufgebraucht wurde. Die Werte für die Hefe-ADH-Hemmung durch Sulfit können daher nicht mit der Aldehydkonzentration verglichen werden.

Während G. P f l e i d e r e r et al. (34) die von Hefe-ADH katalysierte Acetaldehydhydrierung mit Mengen von $> 500 \mu$ Sulfit hemmen konnte, wurden in eigenen Versuchen 100 - 200 μ SO_2 dazu benötigt.

Die von Leber-ADH katalysierte Reaktion konnte von Pfeleiderer mit 20 - 50 μ Sulfit gehemmt werden. In eigenen Hemmversuchen war die Hemmung erst mit 500 μ SO_2 zu erhalten.

Die in eigenen Versuchen erzielte Hemmung der Hefe-ADH und der Leber-ADH bewegte sich ungefähr in der gleichen Größenordnung für die, dazu benötigte, SO_2 -Konzentration. Es konnte auch gezeigt werden, daß eine Hemmung durch Sulfit erst stattfand, wenn die Sulfitkonzentration in den Bereich der Aldehydkonzentration gekommen war. Der Grund für die Hemmung liegt wahrscheinlich in einem Abfangen des, für die Reaktion benötigten, Acetaldehyds durch das Sulfit.

Die Hemmung der Lactat-Dehydrogenase bei der Brenztraubensäurehydrierung dagegen erfolgt bei wesentlich geringeren Sulfitkonzentrationen. Sie ist auch von der Substratkonzentration nicht abhängig, wie folgende Versuche zeigen.

In dem folgenden Testansatz wurde die DPNH-Konzentration, LDH- und Sulfitkonzentration immer konstant gehalten und nur die BTS-Konzentration variiert.

0,02 ml Sulfitlösung = $1,56 \times 10^{-8}$ Mol SO_2 = 1 μ SO_2
0,04 ml DPNH = $5,80 \times 10^{-7}$ Mol
0,03 ml LDH = $4-5 \times 10^{-12}$ Mol
1,90 ml M/15 Phosphatpuffer pH 7,2.

Die Tabelle zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Tab. 22

BTS-Konzentration in Mol	Δ E/Min. ohne SO_2	Δ E/Min. mit SO_2	Hemmung in %
1 $\times 10^{-6}$	0,191	0,0924	51,6
2 $\times 10^{-6}$	0,200	0,0974	51,3
3 $\times 10^{-6}$	0,201	0,1080	46,3
4 $\times 10^{-6}$	0,214	0,1250	41,5
5 $\times 10^{-6}$	0,213	0,1150	46,0

In einem zweiten Testansatz, der folgende Zusammensetzung hatte:

0,05 ml	Sulfitlösung	= $7,8 \times 10^{-8}$ Mol SO_2 = 5 μSO_2
0,04 ml	DPNH	= $5,8 \times 10^{-7}$ Mol
0,03 ml	LDH	= $4-5 \times 10^{-12}$ Mol
1,90 ml	M/15 Phosphatpuffer pH 7,2	

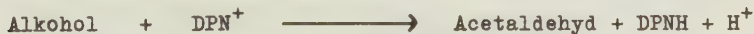
wurden bei höheren BTS-Konzentrationen folgende Ergebnisse erhalten:

Tab. 23

BTS-Konzentration in Mol	$\Delta E/\text{Min.}$ ohne SO_2	$\Delta E/\text{Min.}$ mit SO_2	Hemmung in %
3×10^{-6}	0,423	0,0882	79,2
1×10^{-5}	0,366	0,1130	69,1
2×10^{-5}	0,273	0,1310	52,0
3×10^{-5}	0,193	0,1310	32,3

Es trat hier in den sulfitfreien Proben eine Hemmung durch Substratüberschuß ein. Diese durch das Substrat hervorgerufene Hemmung setzte die Sulfithemmung herab. Es kann gesagt werden, daß die Hemmung der BTS-Hydrierung durch Sulfit in einem großen Bereich (1×10 bis 5×10^{-6} Mol) von der BTS-Konzentration unabhängig ist. Eine geringfügig stärkere Hemmung durch Sulfit erfolgt, wenn keine optimale BTS-Konzentration vorliegt.

Während hier eine Hemmstoffkonzentration erforderlich war, die unter der von BTS und DPNH lag, war bei den Alkohol-Dehydrogenasen eine Hemmstoffkonzentration nötig, die über der von DPNH und im Bereich der Acetaldehydkonzentration lag. Es wurde daher auch die Reaktion:



auf ihre Hemmbarkeit durch Sulfit untersucht.

Die Reaktion wurde nach der Methode von R. B o n n i c h - s e n (90) durchgeführt. Als Substrat diente absoluter Alkohol.

Die zum Test erforderliche Testlösung wurde aus

200,0 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$
 50,0 g Semicarbazidhydrochlorid
 10,0 g Glycin
 200,0 ml 2 N - NaOH

bereitet. Die Bestandteile wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und auf 6 Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 8,8 eingestellt. Die Reaktion wurde in folgendem Testansatz ausgeführt:

2,90 ml Testlösung
 0,10 ml DPN-Lösung = $1,95 \times 10^{-6}$ Mol
 0,04 ml abs. Alkohol
 0,03 ml Leber - ADH = $4,1 \times 10^{-10}$ Mol

Der Zusatz von Sulfit führte zu diesen Ergebnissen:

Tab. 24

SO_2 -Konzentration in Mol	Δ E/Min.	Hemmung in %
0	0,0835	0
$1,50 \times 10^{-6}$	0,0846	0
$2,34 \times 10^{-6}$	0,0815	0
$3,95 \times 10^{-6}$	0,0778	0
$0,78 \times 10^{-5}$	0,0815	0
$1,56 \times 10^{-5}$	0,0743	11

Die Reaktion mit Hefe-ADH wurde in folgender Testzusammensetzung ausgeführt:

2,90 ml Testlösung
 0,10 ml DPN-Lösung = $1,95 \times 10^{-6}$ Mol
 0,04 ml abs. Alkohol
 0,01 ml Hefe-ADH = 5×10^{-11} Mol

Wurde der Testansatz vor der Enzymzugabe mit Sulfitlösung versetzt, so konnte ebenfalls, wie bei der Leber-ADH, keine Hemmung festgestellt werden.

Tab. 25

SO ₂ -Konzentration in 2 Mol	Δ E/Min.	Hemmung in %
0	0,297	0
0,78 x 10 ⁻⁶	0,293	0
3,90 x 10 ⁻⁶	0,294	0
0,78 x 10 ⁻⁵	0,286	0
1,56 x 10 ⁻⁵	0,250	16,0
2,34 x 10 ⁻⁵	0,242	18,5

Die bei hohen Konzentrationen an SO₂ aufgetretene geringe Hemmung ist wahrscheinlich auf eine nicht mehr vollständige Pufferung in dem System zurückzuführen.

Da die Reaktion der Alkoholdehydrierung durch Sulfit nicht hemmbar ist, kann geschlossen werden, daß Sulfit nicht imstande ist, weder die Leber-, noch die Hefe-Alkoholdehydrogenase zu hemmen.

Nach G. P f l e i d e r e r (34) sind alle Dehydrogenasen durch Sulfit hemmbar, die einen bei 320 nm sichtbaren DPN-Sulfit-Enzymkomplex bilden. Da sich die Alkohol-Dehydrogenasen durch Sulfit nicht hemmen ließen, wurde zur Bestätigung noch die Fähigkeit zur Komplexbildung untersucht.

Die Absorptionsmessungen wurden mit 3 ml Phosphatpuffer pH 7,2, die 1,95 - 3,90 x 10⁻⁷ Mol DPN und je 0,5 mg Enzym enthielten, durchgeführt. Mehr Enzym stand für die Messung nicht mehr zur Verfügung. Den Lösungen wurden von 0,78 x 10⁻⁷ bis 7,8 x 10⁻⁶ Mol steigende Mengen an SO₂ zugesetzt.

Bei der Hefe-ADH war keine Extinktionserhöhung bei 320 nm zu beobachten.

Bei der Leber-ADH erfolgte nach Zusatz von Sulfit eine Reduktion des DPN zum DPNH. Die Reduktion von 1,95 x 10⁻⁷ Mol DPN war nach Zusatz von 1,56 x 10⁻⁶ Mol SO₂ vollständig. Sie ließ sich durch weiteren Sulfitzusatz nicht mehr steigern. Die gleiche Menge DPN wurde in Abwesenheit der Leber-ADH von der-

selben Sulfitkonzentration nicht reduziert. Da die Leber-ADH der Firma Boehringer einen Alkoholgehalt von 10% hat, wurde an eine eventuelle Dehydrierung des Alkohols gedacht. Die Reduktion fand aber nicht statt, wenn die Lösung nur Puffer, DPN und Leber-ADH enthielt. Die Leber-ADH, oder andere noch neben der Leber-ADH vorhandenen, fremden Enzyme, z.B. Katalase mußten die Reduktion des DPN durch Sulfit katalysieren.

Es konnte weder bei der Hefe-ADH noch bei der Leber-ADH die Bildung eines DPN-Sulfit-Enzym-Komplexes beobachtet werden. Dies kann als weiterer Beweis dafür gelten, daß die Alkohol-Dehydrogenasen durch Sulfit nicht hemmbar sind.

7. Jodometrische Bestimmung der freien schwefligen Säure in Magensäften und Globinlösungen.

H. Schanderl (7) hatte festgestellt, daß im Wein die Menge der mit Jod titrierbaren freien schwefligen Säure um 52% ansteigt, wenn man den Wein 2 Stunden lang auf 37°C erwärmt. Ferner stellte er eine Zunahme der freien schwefligen Säure fest, wenn er den Wein 1:1 mit Modellmagensäften versetzte und auf 37°C erwärmte.

Seiner Arbeit wurden folgende Ergebnisse entnommen:

Ein Wein mit 23 mg freier schwefliger Säure / Liter hatte	
nach 2 Stunden bei 37°C	40 mg
vermischt mit hyperacidem Magensaft; nach 2 Stunden bei 37°C	40 mg
vermischt mit normacidem Magensaft	" "
vermischt mit subacidem Magensaft	" "
vermischt mit anacidem Magensaft	" "
	43,8 mg
	52,3 mg
	57,8 mg

schweflige Säure / Liter, die mit Jod titrierbar waren.

Nach seinen Angaben nahm der Gehalt an freier schwefliger Säure in den ersten 30 Minuten stark zu, um dann allmählich den, von ihm angegebenen Endwert nach zwei Stunden zu erreichen. Die Zunahme an freier schwefliger Säure ist durch die Temperaturerhöhung größer, als die durch die sub- und anaciden Modellmagensäfte verursachte.

Für die Wirkung der schwefligen Säure im Organismus ist es zwar unwichtig, ob sie in freier oder gebundener Form vorliegt, da sie im Organismus aufgespalten wird. Für die Oxidation im Magen-Darmtrakt muß sie aber in freier Form vorliegen. Da Schanderl in sub- und anaciden Magensäften eine Erhöhung der freien Säure feststellte, muß bei höheren pH-Werten eine Dissoziation der gebundenen Säure eintreten.

Es wurden daher einige Versuche zur Bestimmung der freien schwefligen Säure im Magensaft bei verschiedenen pH-Werten mit 0,01 N Jodlösung durchgeführt.

Es wurden zunächst 10,0 ml Magensaft von pH 2 mit einer Natriummetabisulfitlösung versetzt, deren Gehalt an SO_2 jodometrisch bestimmt worden war. Nach Abzug des Eigenverbrauchs des Magensaftes an Jod, wurden folgende Mengen an freier schwefliger Säure erhalten. Die gleiche Bestimmung wurde in einem Magensaft durchgeführt, der mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 8 gebracht worden war und in einem Magensaft mit einem natürlichen pH-Wert von 7,5.

Tab. 26

Magensaft	Zugesetztes SO_2 in mg/10 ml	Freies SO_2 in mg/10 ml	Gebundenes SO_2 in mg/10 ml
pH 2	2,034	1,547	0,487
pH 8	2,034	1,688	0,346
pH 7,5	1,600	1,393	0,207

Der saure Magensaft hatte zwar mehr Sulfit binden können, als der alkalische, aber die vom Magensaft gebundenen Mengen an Sulfit sind so gering, daß ein Unterschied vom sauren zum alkalischen Magensaft nicht deutlich hervortritt.

Es wurde daher in weiteren Proben das Sulfit in einer acetaldehydhaltigen wässrigen Lösung den Magensäften zugesetzt.

Tab. 27

Probe	pH	Zugesetztes SO_2 in mg/ 10 ml	Freies SO_2 in mg/10 ml	Freies SO_2 in g/100 ml d. zuges. Menge
Acetaldehydlösung	5	2,043	0,4995	24,5
Acetaldehydlösung u. Magensaft	2	2,043	0,575	28,3
" "	2	1,60	0,0	0
" "	4	1,60	0,219	13,7
" "	7,5	1,60	0,342	21,4
" "	8	2,043	0,893	44,0
" "	9	1,60	0,595	37,2

Die Werte zeigen, daß der Magensaft mit steigendem pH-Wert mehr schweflige Säure aus ihrer Acetaldehydverbindung in Freiheit setzen kann, daß aber der Grad der Freisetzung davon abhängt, welche Bindungsverhältnisse vorliegen. Liegt bei pH 2 kein freies SO_2 vor, so wird im schwach alkalischen Milieu bei pH 7,5 - 8 prozentual mehr SO_2 in Freiheit gesetzt werden, als dies der Fall ist, wenn bei pH 2 ein Überschuß an SO_2 gegenüber dem vorhandenen Aldehyd oder anderen Bindungspartnern vorliegt.

Die Zunahme der freien schwefligen Säure in Magensäften mit steigendem pH-Wert ist nun aber keineswegs eine Eigenschaft der Magensäfte, sondern ist allein auf den pH-Wert zurückzuführen. Eine wässrige Aldehyd-Sulfitlösung zeigt nämlich ebenfalls mit Erhöhung des pH-Wertes eine Zunahme an freier schwefliger Säure. Der Magensaft beeinflusst aber den Grad der Dissoziation, da er ebenfalls, wenn auch nur in kleinen Mengen, Sulfit binden kann.

Eine wässrige Acetaldehydlösung, der Sulfit zugesetzt worden war, zeigte folgende Zunahme an freier schwefliger Säure, wenn der pH-Wert der Lösung mit Natronlauge erhöht wurde.

Tab. 28

SO_2 -Aldehydlösung pH	Freies SO_2 in g/100 ml
2,0	0
5,5	0
7,0	9,8
8,0	40,0
9,0	49,4

Die Veränderung in der Zunahme der freien schwefligen Säure in einer wässrigen, sulfithaltigen Acetaldehydlösung durch Magensaft zeigt folgende Tabelle:

Tab. 29

Probe	pH	Freies SO ₂ in g/100 ml
SO ₂ -Aldehydlösung	5,0	25,0
SO ₂ -Aldehydlösung	9,0	83,0
SO ₂ -Aldehydlösung	10,0	100,0
SO ₂ -Aldehydlösung und Magensaft	1,0	21,7
" "	2,0	21,3
" "	5,0	27,1
" "	7,0	30,4
" "	9,0	78,5
" "	10,0	99,5

In einer Acetaldehyd-Sulfitlösung, die einen großen Überschuß, als zur Abbindung des SO₂ erforderlich war, enthielt, konnte freie schweflige Säure erst bei einem pH-Wert von über 10 mit Jod nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß zwar die Dissoziation der Aldehydbisulfitverbindung mit steigendem pH-Wert zunimmt, daß aber keine quantitativen Aussagen gemacht werden können, welche Mengen an schwefliger Säure im alkalischen Milieu des Darmes oder des Magens in Freiheit gesetzt werden. Der Grad der Freisetzung hängt davon ab, welche Bindungsverhältnisse und welche Verdünnungen vorliegen und ob das Sulfit im Überschuß vorhanden ist oder die Bindungskomponenten. Dies wird von Fall zu Fall verschieden sein. Hat man eine eindeutig definierte Verbindung vorliegen, so kann deren Dissoziation bei den verschiedenen pH-Werten berechnet werden, wie es Y. T o m o d a (91) für das Acetaldehydsulfonat mit einer angenommenen Reinheit von 100% getan hat.

Diese reine Verbindung unterliegt erst einer Dissoziation ab pH 8, wenn keine Bisulfitionen mehr in der Lösung vorhanden sind (Abb. 18).

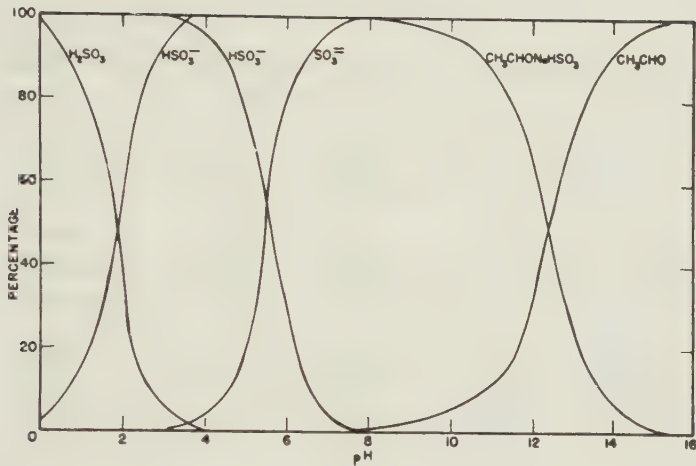


Abb. 18 Dissoziation des Acetaldehydsulfonats bei verschiedenen pH-Werten nach T o m o d a .

Die Abb. 18 wurde der Arbeit von M.A. Joslyn und J.B.S. Braveman (3) entnommen.

Es wurde noch jodometrisch untersucht, ob Sulfit eine Additionsverbindung mit dem, aus Hämoglobin abgespaltenen, Globin eingeht. Jeweils 5 ml Globinlösung wurden mit HCl oder NaOH auf verschiedene pH-Werte eingestellt und mit 2 ml Natriummetabisulfitlösung versetzt. Die Mischung wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und nach dem Ansäuern mit 0,01 N Jodlösung titriert.

Bei einem physiologischen pH-Wert von 7 dürften 10% des vorhandenen SO_2 gebunden werden. Da das Volumen der Globinlösung das gleiche der ursprünglichen Blutmenge war, kann angenommen werden, daß im Blut auch 10% der SO_2 -Menge an das Hämoglobin gebunden werden, falls die Erythrocytenmembran auch für zweiwertige Anionen durchlässig ist.

Tab. 30

Probe	pH	Freies SO ₂ in mg	Freies SO ₂ in g/100 ml d. zugesetzten Menge
SO ₂ -Lösung	5	2,69	100
SO ₂ -Lösung	5	1,25	100
SO ₂ -Globin	2	2,20	82
SO ₂ -Globin	2	1,05	85
SO ₂ -Globin	4	2,41	89,5
SO ₂ -Globin	4	1,13	90,4
SO ₂ -Globin	8	2,37	88,3
SO ₂ -Globin	8	1,10	88
SO ₂ -Globin	9	2,48	92,5
SO ₂ -Globin	9	1,18	94,5

Z u s a m m e n f a s s u n g

Zu 1)

Die Bestimmung der schwefligen Säure in biologischen Flüssigkeiten ist schwierig. Eine direkte Bestimmung kann in vielen Fällen nicht durchgeführt werden, und eine Isolierung schafft Veränderungen der untersuchten Probe, bei denen Reaktionen eintreten können, die bei physiologischen Bedingungen nicht möglich sind.

Es wurde zunächst nach einer Methode gesucht, die es erlaubte, das Sulfit ohne vorausgehende Isolierung direkt zu bestimmen.

Der Hemmungstest, bei dem die durch Lactat-Dehydrogenase katalysierte Brenztraubensäurehydrierung von Sulfit gehemmt wurde (34), wurde auf die Möglichkeit einer direkten, quantitativen Sulfitbestimmung untersucht. Die Hemmung konnte nur in einem engen Bereich von 0,5 - 5,0 μ SO₂/2,0 ml Testlösung zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden. Die Grenzen der bestimmbaren Konzentrationen an SO₂ werden durch die einzupipettierenden Mengen gegeben und liegen zwischen 3 und 200 ppm. Aus der statistischen Fehlerbreite wurde eine Empfindlichkeit von 0,3 μ SO₂ pro Testansatz berechnet. Der Fehler verringert sich also mit steigenden Konzentrationen, wird aber durch das dann einzupipettierende kleine Volumen oder durch eine Verdünnung wieder ausgeglichen. Die Sulfithemmung ist stark abhängig von der DPNH-Lösung, deren Stabilität rasch abnimmt. Für jede Sulfitbestimmung muß daher gleichzeitig eine neue Eichkurve mit Lösungen von bekanntem Sulfitgehalt aufgenommen werden. Dies verzögert die ansonsten schnelle und bequeme Sulfitbestimmung. Für Proben verschiedenen Gehaltes, die zu verschiedenen Zeiten bestimmt wurden, wurde daher ebenfalls die Standardabweichung berechnet und deren Fehler als allgemeiner Fehler der Methode aufgenommen. Der Fehler wurde in ppm ausgedrückt und betrug $\pm 11,15$ ppm SO₂ = $\pm 1,115$ mg/100 ml. In stark gefärbten und proteinhaltigen Lösungen war die direkte Bestimmung nicht mehr möglich. Das Sulfit wurde durch Destillation aus

den angesäuerten Proben isoliert. Für das isolierte SO_2 konnte auch eine Methode benützt werden, die eine geringere Fehlerbreite als die enzymatische Bestimmung besaß. Die Bestimmung mit Fuchsin und Formaldehyd nach der Methode von West und Gaekle (65) wurde auf ihre Brauchbarkeit untersucht. Die Empfindlichkeit lag bei $1 \mu\text{g SO}_2/10,0 \text{ ml}$. Die Fehlergrenze für Proben verschiedenen Gehaltes wurde mit $\pm 3,8 \text{ ppm SO}_2 = \pm 0,38 \text{ mg}/100,0 \text{ ml}$ bestimmt. Es wurde die Anwendbarkeit der enzymatischen Methode in der SO_2 -Bestimmung bei Lebensmitteln in einigen Proben geprüft. Ihrer schnellen und bequemen Ausführung bei flüssigen, wenig gefärbten Proben, wenn keine Destillation notwendig ist, steht ihre hohe Fehlergrenze und ihre Kostspieligkeit entgegen. Zur Bestimmung von SO_2 im Wein kann sie nicht verwandt werden, da sie die gebundene Säure nur zum Teil, aber nicht vollständig erfaßt.

Zu 2)

Je 100 ml Speichel von 6 Versuchspersonen hatten nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C $0,88 - 2,76 \text{ mg SO}_2$ oxidiert. Die oxidierten Mengen waren von der Art, aber nicht vom pH-Wert des Speichels abhängig.

Von den untersuchten Magensäften zeigten nur die alkalischen eine Sulfitoxidation. Die Oxidation erfolgte spontan. 100 ml alkalischer Magensaft oxidierten durchschnittlich $5,10 \text{ mg SO}_2$.

Von 100 ml A-Galle wurden durchschnittlich $5,6 \text{ mg SO}_2$ oxidiert. 100 ml B-Galle konnten durchschnittlich $7,45 \text{ mg SO}_2$ oxidieren, so daß von 100 ml Duodenalsaft $5 - 7,5 \text{ mg SO}_2$ oxidiert werden können. Es wird angenommen, daß es sich bei der Oxidation des Sulfits um eine Autoxidation handelt. Diese Autoxidation muß aber vom Magen- und Duodenalsaft katalysiert werden, da eine alkalische Lösung von Biliverdin und Bilirubin keine Sulfitoxidation zeigte, auch nicht nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden.

Ein Leberhomogenisat zeigte eine Sulfitoxidation, die, da es sich um einheitliches Material handelte, bei gleicher Lebermenge mit doppelter Sulfitkonzentration um das Doppelte zunahm. Dies schließt eigentlich eine direkte Beteiligung der Leber an der Oxidation aus. Eine aerobe Oxidation des Sulfits bei 37°C ,

katalysiert durch die Leber, konnte nicht beobachtet werden, da die mit Sulfid versetzte Leber bei der Untersuchung in der Warburg-Apparatur keinen Sauerstoffmehrerbrauch zeigte. Ob es sich bei der Oxidation des Sulfids in den Leberhomogenisaten um eine Oxidation handelte, die erst bei der Destillation stattfand, oder um eine anaerobe bei 37°C, konnte nicht entschieden werden. Von 100,0 g Leber wurden 40 - 60% des zugesetzten Sulfids oxidiert.

Zu 3)

Die vom Blut oxidierten Mengen Sulfid wurden von dem Sauerstoff oxidiert, der bei der Destillation durch Denaturierung des Hämoglobinmoleküls in Freiheit gesetzt wurde. Der freiwerdende Sauerstoff setzte sich quantitativ mit dem Sulfid um. Im Warburg-Gerät wurde bei sulfidbehandeltem Blut keine vermehrte Sauerstoffaufnahme beobachtet.

Zu 4)

Mit Sulfid versetzte Blutproben wurden spektralphotometrisch untersucht, um nachzuweisen, ob eine Oxidation des Sulfids auch erfolgen kann, wenn das Oxyhämoglobinmolekül intakt ist. In gepufferten, verdünnten Blutlösungen wurde das Oxyhämoglobin erst ab 4,0 g SO₂ pro 100 ml Blut reduziert. Eine Oxidation des Sulfids unter physiologischen Bedingungen ist daher nicht anzunehmen.

Eindeutige spektrale Veränderungen bei reduziertem Hämoglobin, Methämoglobin und Häm in durch Sulfid, die auf eine Ligandenbindung des Sulfids an das Eisen-Zentralion schließen lassen, konnten nicht beobachtet werden. Es wurde aber eine Beeinflussung des Porphyrinspektrums festgestellt.

Zu 5)

Eine Reaktion von Sulfid mit den Eiweißstoffen des Blutes und dem Globin selbst, die in einer Zunahme von SH-Gruppen durch Sprengung von Disulfidverbindungen resultierte, konnte mit den angewandten Methoden nicht festgestellt werden.

Zu 6)

Es wurde der Beweis erbracht, daß Sulfit nicht imstande ist, die Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber und Hefe zu hemmen. Die Hemmung der Acetaldehydhydrierung erfolgte erst bei Sulfitkonzentrationen, die im Bereich der Acetaldehydkonzentration lagen. Die Hemmung war auf eine Reaktion des Sulfits mit dem Substrat zurückzuführen.

Es konnte kein Enzym-DPN-Sulfit-Komplex nachgewiesen werden. Die Leber-Alkohol-Dehydrogenase oder die in ihr enthaltenen Fremdaktivitäten vermochten die Reduktion von DPN durch Sulfit zu katalysieren.

Zu 7)

In einigen Versuchen wurde festgestellt, daß mit Jod bestimmbare freie schweflige Säure mit Erhöhung des pH-Wertes in Acetaldehydlösungen und in Magensäften, die Acetaldehyd enthielten, zunahm. Der Magensaft veränderte etwas die Zunahme der freien schwefligen Säure gegenüber der, in einer reinen Aldehydlösung. Die Menge der freigesetzten schwefligen Säure hängt von den Bindungsverhältnissen ab. Lag bei pH 2 keine freie schweflige Säure vor und waren gerade äquivalente Mengen Acetaldehyd gebunden, so war die prozentuale Zunahme der freien schwefligen Säure größer, als bei einem Überschuß an Sulfit. War aber ein großer Überschuß an Acetaldehyd vorhanden, so trat eine Dissoziation erst bei pH-Werten über 10 ein. Die Dissoziation der Acetaldehydverbindung im alkalischen Milieu hängt sehr von der vorhandenen Sulfit- und Aldehydkonzentration ab. Die Zunahme der freien schwefligen Säure im schwach alkalischen Milieu wird demnach von Fall zu Fall verschieden sein und von der Art der Additionsverbindung und der Konzentration abhängen. Sie kann bei pH 7 bis 8 zwischen 10 und 20% betragen. Globinlösungen bei pH 8 hatten durchschnittlich nur 10% der zugesetzten Sulfitmenge gebunden.

Eine schematische Darstellung über den möglichen Weg des Sulfit im Organismus gibt Abb. 19. Das Sulfit kann nach der Resorption im Duodenum oder Dünndarm von der Pfortader zur Leber transportiert werden. Falls hier keine vollständige Oxidation stattfindet, gelangt das Sulfit auf dem Blutweg in die einzelnen Organe und zwar in der Reihenfolge der Nummerierung. Die Organe, in denen eine Sulfitoxidation stattfinden kann, wurden punktiert gezeichnet.

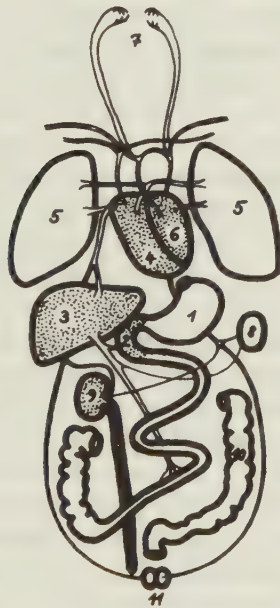


Abb. 19 Weg des Sulfit im Organismus.

1 = Magen, 2 = Duodenum, 3 = Leber, 4 = r. Herzkammer,
5 = Lungen, 6 = l. Herzkammer, 7 = Gehirn, 8 = Milz,
9 = Nieren, 10 = Dickdarm, 11 = Testes.

Punktierte Organe = Orte der möglichen Sulfitoxi-
dation.

D i s k u s s i o n

Die in vitro erhaltene Sulfitoxidation bei Speichel, alkalischem Magensaft und Duodenalsaft kann auch auf die Verhältnisse in vivo übertragen werden, da beim Essen immer Luft mitgeschluckt wird. Die vom Speichel oxidierten Mengen können vernachlässigt werden, da Flüssigkeiten kaum mit Speichel in Berührung kommen und gleich hinuntergeschluckt werden. Die Oxidation im alkalischen Magensaft kann auch vernachlässigt werden, da im sauren Magensaft allgemein keine Oxidation erfolgt und sie daher nicht den Normalfall darstellt. Als einziger Ort der Oxidation vor der Resorption bleibt der Darm. Von 100 ml Duodenalsaft konnten 50 - 75 ppm SO_2 oxidiert werden. Im alkalischen Milieu des Darmes können auch die SO_2 -Additionsverbindungen zu 10 bis 20% aufgespalten werden. Wie B. B a g h a t und M.F. L o c k e t t (19) feststellten, wurden nur 55% der Schwefelmenge von eingegebenen Metabisulfitlösungen nach 4 Stunden im Harn als Sulfat ausgeschieden, während es bei der intraperitonealen Injektion der gleichen Lösung 80 - 90% waren. Es kann daher sein, daß der andere Teil der per os gegebenen Sulfitlösung schon im Darm oxidiert wurde und gar nicht zur Resorption gelangte, da Sulfat schwer resorbierbar ist. Obwohl diese Versuche an Ratten durchgeführt wurden, können die Verhältnisse im menschlichen Organismus genau so liegen. Von Schweine- und Rinderleber wurden 40 - 60% des zugesetzten Sulfits oxidiert. Ob diese Oxidation auf die von amerikanischen Arbeiten (22 - 33) beschriebene Sulfitoxidase zurückzuführen ist, wurde nicht nachgeprüft. Ein erhöhter Sauerstoffverbrauch, der auf eine aerobe Sulfitoxidation hätte schließen lassen, wurde bei sulfitbehandelten Proben bei 37°C nicht festgestellt.

Eine Oxidation von SO_2 im Blut, die eine gleichzeitige Reduktion des Oxyhämoglobins einschließt, ist bei den, aus Nahrungsmitteln resorbierbaren, SO_2 -Mengen nicht zu erwarten. Eine Reduktion des Oxyhämoglobins wurde erst bei 4,0 g

SO_2 in 100 ml Blut beobachtet. Das schließt aber nicht aus, daß das Sulfit, wenn in vivo das Oxyhämoglobin an Stellen mit geringem O_2 -Partialdruck seinen O_2 zum Teil abgibt, diesen Sauerstoff zu seiner Oxidation verbraucht, und die Sauerstoffversorgung der Gewebe dadurch beeinträchtigt wird. Eine Beeinflussung des Hämoglobinmoleküls durch Bindung von Sulfit ist bei Sulfitmengen unter 4 g SO_2 /100 ml Blut auch nicht anzunehmen, da die Erythrozytenmembran nur für einwertige Anionen durchlässig ist (72) und bei dem physiologischen pH-Wert des Blutes von pH 7,3 - 7,5 nur 1,4 - 0,4% des Sulfits als HSO_3^- -ion vorliegen (2).

Da das Sulfit im Organismus wahrscheinlich nicht sofort quantitativ oxidiert werden kann, ist eine Reaktion des Sulfits mit verschiedenen Verbindungen im Organismus nicht ausgeschlossen. Von diesen Reaktionen ist bis jetzt nur die Hemmung von Dehydrogenasen, die eine Säure als Substrat haben (34), nachgewiesen. Eine Reaktion des Sulfits mit Disulfidgruppen wird nicht eintreten können, da dazu ein großer Überschuß an Sulfit notwendig ist. Eine Reduktionswirkung des Sulfits ist bei diesen Mengen ohne einen Katalysator oder ein katalytisch wirkendes Enzym ausgeschlossen. In jedem Fall aber werden Veränderungen, die durch Sulfit im Organismus auftreten, reversibel sein, da das Sulfit als, beim Eiweißabbau auftretender natürlicher Bestandteil (21), oxidiert wird (33) und etwa aufgetretene Additionsverbindungen gespalten werden können (22).

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Rahn, O. Ind. Eng. Chem. 36, 185 (1944)
Conn, I.E.
- 2) Vas, K. Food Manuf. 24, 414 (1949)
Ingram, H.
- 3) Joslyn, M.A. Adv. Food Research 5, 97 (1954)
Braveman, J.B.S.
- 4) Clarke, H.T. J. Biol. Chem. 97, 235 (1935)
- 5) Stricks, W. J. Am. Chem. Soc. 73, 4569 (1951)
Kolthoff, J.M.
- 6) Bailey, J.L. J. Biol. Chem. 234, 1733 (1959)
Cole, R.D.
- 7) Schanderl, H. Wein u. Rebe 35, 328 u. 342 (1954)
- 8) Eichholtz, F. Lehrbuch d. Pharmakologie
8. Aufl. Berlin (1955)
- 9) Starkenstein, E. Lehrbuch d. Toxikologie
Rost, E. 1. Aufl. Berlin/Wien (1929)
Pohl, J.
- 10) Sonntag, G. Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt
21, 285 (1904)
- 11) Franz, F. Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt
Sonntag, G. 28, 225 (1908)
- 12) Rost, E. Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt
Franz, F. 43, 187 (1912)
- 13) Rost, E. Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt
Franz, F. 21, 312 (1904)
- 14) Rost, E. Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt
Jürss, F. 34, 377 (1910)
- 15) Jakoby, C. Arch. experim. Pathologie u.
Walbaum, H. Pharmakologie 54, 421 (1906)
- 16) Rehm, H.J. ZUL 118, 413 (1962) und
Wittmann, H. ZUL 120, 465 (1963)
- 17) Lang, K. Schriftenreihe d. Bundes f. Lebens-
mittelrecht u. Lebensmittelkunde
Heft 31, Hamburg-Berlin-Düsseldorf
(1960)

- 18) Lockett, M.F. J. of Pharmac. and Pharmacol.
 Natoff, I.L. 12, 488 (1960)
- 19) Baghat, B. J. of Pharmac. and Pharmacol.
 Lockett, M.F. 12, 690 (1960)
- 20) Sorbo, B.H. Biochim. and Biophys. Acta
 24, 324 (1957)
- 21) Singer, T.P. Biochim. and Biophys. Acta
 Kearney, E.B. 14, 570 (1954)
- 22) Heimberg, M. J. Biol. Chem. 204, 913 (1953)
 Fridovich, I.
 Handler, Ph.
- 23) Fridovich, I. Fed. Proceed. 13, 212 (1954)
 Handler, Ph.
- 24) Fridovich, I. Fed. Proceed. 14, 214 (1955)
 Handler, Ph.
- 25) Fridovich, I. J. Biol. Chem. 221, 323 (1956)
 Handler, Ph.
- 26) Fridovich, I. J. Biol. Chem. 223, 321 (1956)
 Handler, Ph.
- 27) Boyer, P.D. J. Am. Chem. Soc. 76, 4331 (1954)
- 28) Fridovich, I. J. Biol. Chem. 228, 67 (1957)
 Handler, Ph.
- 29) Fridovich, I. J. Biol. Chem. 233, 1581 (1958)
 Handler, Ph.
- 30) Fridovich, I. J. Biol. Chem. 236, 1836 (1961)
 Handler, Ph.
- 31) MacLeod, R.M. J. Biol. Chem. 236, 1841 (1961)
 Farkas, W.
 Fridovich, I.
 Handler, Ph.
- 32) Schneider, W.C. J. Biol. Chem. 183, 123 (1950)
 Hogeboom, G.H. zit. nach (31)
- 33) MacLeod, R.M. J. Biol. Chem. 236, 1847 (1961)
 Fridovich, I.
 Handler, Ph.
- 34) Pfleiderer, G. Biochem. Ztschr. 328, 187 (1956)
 Jeckel, D.
 Wieland, Th.

- 35) Diemair, W. Dissertation, Universität
Koch, J. Frankfurt a.M. (1959)
Heß, D.
- 36) Hamburger, J.J. Food Research 6, 599 (1941)
Joslyn, M.A. zit. nach (3)
- 37) Busing, K.H. Klin. Wochenschr. 17, 1766 (1938)
Raabe, W. zit. nach (3)
- 38) Morgan, A.F. J. Biol. Chem. 82, 579 (1929)
Field, A. zit. nach (3)
- 39) Williams, R.R. J. Am. Chem. Soc. 57, 536 (1935)
Waterman, R.E. zit. nach (3)
Keresztesy, J.C.
Buchman, E.R.
- 40) Buchman, E.R. J. Am. Chem. Soc. 57, 1848 (1935) u.
J. Am. Chem. Soc. 58, 1803 (1936)
zit. nach (3)
- 41) Lockett, M.F. J. of Pharmac. and Pharmakol.
 9, 605 (1957)
- 42) Rein, H. Physiologie des Menschen
Schneider, M. 14. Aufl. Berlin (1960)
- 43) Karlson, P. Lehrbuch d. Biochemie
 2. Aufl. Stuttgart (1961)
- 44) Cremer, H. ZUL 70, 315 (1935)
- 45) Heeg, E. Dissertation, Universität Mainz
 (1958)
- 46) Ripper, M. Allg. Weintzg. 15, 363 (1898) und
 Allg. Weintzg. 17, 71 (1909)
- 47) Diemair, W. ZUL 113, 287 (1960)
Koch, J.
Heß, D.
- 48) Monier-Williams, G.W. Determination of Sulphur Dioxide
 in Foods. Rept. Public Health and
 Med. Subjects Nr. 43, Ministry of
 Health, London (1927)
- 49) Rothenfusser, S. ZUL 58, 98 (1929)
- 50) Reith, J.F. ZUL 108, 270 (1958)
Willems, J.J.L.
- 51) Wilson, H. J. appl. Chem. 4, 488 (1954)
Pearson, R.M.
Witzgerald, J.

- 52) Wieland, Th.
Pfleiderer, G. Biochem. Ztschr. 329, 112 (1957)
- 53) Pfleiderer, G.
Jeckel, D. Biochem. Ztschr. 330, 296 (1958)
Wieland, Th.
- 54) Pfleiderer, G. Biochem. Ztschr. 329, 370 (1957)
Jeckel, D.
- 55) Bergmeyer, H.U. Methoden der enzymatischen Analyse
1. Aufl. Weinheim (1962)
- 56) Pfleiderer, G. Biochem. Ztschr. 329, 104 (1957)
Jeckel, D.
Wieland, Th.
- 57) Wieland, Th. Biochem. Ztschr. 331, 103 (1959)
Pfleiderer, G.
Ortanderl, F.
- 58) Straub, F.B. Biochemic. J. 34, 483 (1940) und
Z. physiol. Chemie 275, 63 (1942)
- 59) Keilin, D. Proc. Roy. Soc. London
Hartree, B.F. Series B 121, 173 (1936)
- 60) Beisenherz, G. Z. Naturforschg. 8 b, 555 (1953)
Bücher, T.H.
Boltze, J.H.
Czok, R.
Garbade, K.H.
Meyer-Arendt, E.
Pfleiderer, G.
- 61) Rauen, H.M. Biochem. Taschenbuch, S. 697
Berlin, Göttingen, Heidelberg (1956)
- 62) Dörffel, K. Beurteilung v. Analysenverfahren
u. Ergebnissen, Berlin (1962)
- 63) Richter, I. ZUL 106, 337 (1957)
Kny, L.
- 64) Dupaigne, P. Ann. Falsificat. Fraudes
44, 111 (1951)
- 65) West, Ph.W. Analyt. Chemistry 28, 1816 (1956)
Gaeke, G.C.
- 66) Diemair, W. Dissertation, Universität
Bauer, H. Frankfurt a.M. (1962)
- 67) Bamann, E. Methoden d. Fermentforschung
Myrbäck, K. Bd. 1, 985, Leipzig (1941)

- 68) Betke, K. Biochem. Ztschr. 320, 431 (1950)
Savelsberg, W.
- 69) . Vorschriftenbuch zum Photometer
Eppendorf, v. Fa. Netheler u. Hinz
- 70) Rubner, M. Hygienische Rundschau 13, 329 (1903)
- 71) Holling, H.E. J. appl. Physiology 8, 249 (1955/56)
MacDonald, I.
O'Halloran, J.A.
Venner, A.
- 72) Hoppe-Seyler, F. Physiol. u. Pathol. Chem. Analyse
Thierfelder, H. 9. Aufl., Berlin (1924)
- 73) Leuthardt, F. Lehrbuch d. physiol. Chemie
14. Aufl., Berlin (1959)
- 74) Scheler, W. III. Humboldt-Symposium üb. Grund-
fragen d. Biologie, Berlin (1960),
VEB-Fischer Verlag, Jena (1962)
- 75) Scheler, W. Biochem. Ztschr. 332, 343 (1959/60)
- 76) Scheler, W. Biochem. Ztschr. 326, 295 (1955)
Scheler, K.
Jung, F.
- 77) Fischbach, K. Dissertation, Vet. Med. Fak.
Gießen (1956)
- 78) Keilin, D. Nature 139, 548 (1937)
Hartree, E.F.
- 79) Scheler, W. Biochem. Ztschr. 332, 542 (1960)
Fischbach, I.
- 80) Gattermann, L. Praxis d. organ. Chemikers
Wieland, H. 23. Aufl. 293, Berlin, Leipzig
(1933)
- 81) Schöberl, A. Ber. 70, 1422 (1937)
Ludwig, E.
- 82) Schöberl, A. Ber. 71 B, 2361 (1938)
Krumey, F.
- 83) Flaschenträger, B. Physiol. Chemie, Bd. 1
Lehnartz, E. 708, Berlin (1951)
- 84) Bfezina, M. Die Polarographie in d. Medizin,
Zuman, P. Biochemie u. Pharmazie
1. Aufl. Leipzig (1956)

- 85) Schwabe, K. Polarographie u. Chem. Konstitution
Organ. Verbindungen, Scientia
Chimica, Bd. 8, Berlin (1957)
- 86) Roberts, E. Analyt. Chem. 30, 1291 (1958)
Rouser, G.
- 87) Broekhuysen, J. Analyt. Chim. Acta 19, 542 (1958)
- 88) Gregory, J.D. J. Am. Chem. Soc. 77, 3922 (1955)
- 89) Alexander, N.M. Analyt. Chem. 30, 1292 (1958)
- 90) Bergmeyer, H.U. Methoden d. enzymat. Analyse
1. Aufl., 285, Weinheim (1962)
- 91) Tomoda, Y. J. Soc. Chem. Ind. (Japan)
30, 747 (1927)



L e b e n s l a u f

Am 22. September 1935 wurde ich, Ingeborg Engelhardt, als erstes Kind des damaligen Tierarztes Dr. Hermann Engelhardt und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Tauchen in Asch/Sudetenland geboren.

Von Herbst 1941 bis März 1945 besuchte ich die Volksschule in Asch. Nach der Ausweisung im Juni 1946 mußte ich zunächst bis Ostern 1949 meinen Schulunterricht an der Volksschule in Rudingshain, Kreis Büdingen, fortsetzen. Ostern 1949 trat ich dann in die Untertertia des Realgymnasiums in Schotten ein. Ab Ostern 1952 besuchte ich das Realgymnasium in Michelstadt/Odenwald. Diese Schule verließ ich 1955 mit dem Reife-Zeugnis und trat als Praktikantin in die Apotheke in Hirschhorn/Neckar ein.

Nach abgelegter pharmazeutischer Vorprüfung im März 1957, begann ich im Sommersemester 1957 das Studium der Pharmazie an der Universität in Mainz. Im Wintersemester 1957/58 wechselte ich die Universität und setzte mein Studium in Frankfurt am Main fort. Am 30. April 1960 beendete ich das Studium der Pharmazie mit dem pharmazeutischen Staatsexamen. Im Mai 1960 begann ich meine Tätigkeit als Praktikantin im Städtischen Lebensmittel-Untersuchungsamt in Frankfurt am Main und zugleich das Studium der Lebensmittelchemie. Am 10. Juli 1961 legte ich die Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker ab. Von Juli bis Dezember 1961 war ich zur Erlangung der Approbation als Kandidatin der Pharmazie in der Kur-Apotheke in Bad Vilbel tätig. Im Januar 1962 übertrug mir Herr Professor Dr. Dr. W. D i e m a i r vorliegende Arbeit.

